

# Scleroglucan als Antibiotikaersatz in der Tierzucht

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Julika Susanne Wrenger  
aus Oldenburg (Oldb)

1. Referent: apl. Professor Dr. Udo Rau  
2. Referent: apl. Professor Dr. Sigmund Lang

Eingereicht am: 05.09.2011

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.12.2011

Druckjahr 2012

## Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

## Publikationen

Rau U., Kuenz A., Wray V., Nimitz M., Wrenger J., Cicek H., (2009). Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes (Coriolus) versicolor* ATCC 200801. Applied Microbiol and Biotechnology 81(5):827-37

Bimczok D., Wrenger J., Schirrmann T., Rothkötter H-J., Wray V., Rau U., (2009) Short chain regioselectively hydrolyzed scleroglucans induce maturation of porcine dendritic cells. Applied Microbiol and Biotechnology 82(2):321-31

## Tagungsbeitrag

Wrenger J., Hevekerl A., Breves G., Rau U., (2009) Scleroglucan als Antibiotikaersatz in der Tierzucht. Chemie Ingenieur Technik 81:1228-1229

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herr Prof. Dr. U. Rau am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Herrn Prof. Dr. U. Rau

Danke ich herzlich für die Möglichkeit zur Promotion, die Unterstützung während der Bearbeitung, sowie die vielen konstruktiven Gespräche.

Herrn Prof. Dr. S. Lang danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Hilfestellungen und fachlichen Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Dazu gehört insbesondere Wolfgang Graßl für die Hilfe und die Geduld bei vielen technischen Fragen. Dr. Thomas Schirrmann für die gute Zusammenarbeit und Diskussion bei immunologischen Themen.

Prof. Breves vom Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich für die Bereitstellung von Darminahlt und der Verwendung der Ussing-Kammer.

Prof. Dr. Rothkötter und Frau Dr. Bimczok von der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg danke ich für die Zusammenarbeit und die Zellkulturuntersuchung.

Dr. Wray vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig danke ich für die <sup>13</sup>C-NMR Untersuchung.

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mit mir das Labor geteilt haben und mich im Laufe der Jahre durch fachliche und weniger fachliche Diskussionen unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt hier Dieter, allen Gestaltern der Kaffeepause und dem gemeinsamen Laufen.

## **I. Abkürzungsverzeichnis**

% wt	Gewichtsprozent
[ $\eta$ ]	intrinsischen Viskosität
[ $\eta$ ]std	intrinsischen Viskosität eines Polymerstandards
$\mu$ S	mikro Siemens
A	Amper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AS100	CelluPract AS 100
BFM	Biofeuchtmasse
BGN13.1	Genbezeichnung der zu amplifizierenden Endo- $\beta$ -1,3-Glucanase
bp	Basenpaare
BRENDA	Braunschweiger Enzymdatenbank
BTM	Biotrockenmasse
CAZY	Carbohydrate active enzymes
CECT	„The Spanish Type Culture Collection“
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CR-3	Komplementrezeptor 3
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DI	Darminhalt
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DS	Substitutionsgrad
dsRNA	doppelsträngige RNA
EC-Nummer	Enzyme Commission Nummern (numerisches Klassifikationssystem für Enzyme)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	Exopolysaccharid
EtOH	Ethanol
GALT	darmassoziierte Immunsystem (eng. gut associated lymphoid tissue)
Gen	Gentiobiose
GFP	Gefriertrocknungsprodukt von RH
Glc	Glucose
GoI	„Gene-of-Interest“ = Das Gen welches amplifiziert werden soll
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IEL	intraepithelialen Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kb	Kilobasen(paare)
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molmasse
MAC	membrane attack complex
MALT	mukosaassoziierte Immunsystem
Mi	Molare Masse der Polymere der Fraktion i

Mn	Zahlenmittel der Molmasse
MoDC	Monocyten-abgeleitete Dendritische Zellen
Mp	Molekulargewicht am Signalmaximum
MPG	Malzextrakt-Pepton-Glucose-Medium
Mstd	Molekulargewicht eines Polymerstandards
Mw	Mittleres Molekulargewicht
Mw	Gewichtsmittel der Molmasse
Ni	Anzahl der Makromoleküle in der Fraktion i
NK	Natural Killer Zellen
nScl	Native Scleroglucan
P	Zellpellet
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ = Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Polydispersitäts Index
PE	Polyethylen
Pfu	„Pfu DNA Polymerase“ von „Fermentas“
Phusion	„Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase“ von „Finnzymes“
Phusion-HF-PCRPuffer	Standard-PCR-Puffer der „Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase“
PP	Payerschen Platten
rE	reduzierende Enden
RH	Probe der Hydrolyse
RI	refractive index (Brechungsindex)
RIG-1	retinoic acid inducible gene-1
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	„sodium dodecylsulfate“ = Natriumdodecylsulfat
sscDNA	„single stranded complementary DNA“
ssDNA	"single stranded DNA"
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	„Platinum Taq DNA Polymerase“ von „Invitrogen“
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLR	Toll like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜP	Überstand-Zellpellet
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultra-Violett
V	Volt
Ve	Elutionsvolumen
Vh	hydrodynamische Volumen
η	Viskosität

## II. Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Polysaccharide.....	1
1.1.1.	Vorkommen .....	1
1.1.2.	Eigenschaften.....	3
1.1.3.	Anwendung .....	5
1.2.	Schizophyllan / Scleroglucan .....	6
1.2.1.	Funktion und Wirkung.....	6
1.2.2.	Unterschiede .....	8
1.3.	$\beta$ -Glucanase.....	8
1.3.1.	Vorkommen und Eigenschaften.....	8
1.3.2.	Hydrolyse.....	9
1.4.	Immunsystem .....	10
1.4.1.	Rezeptoren für Oligosaccharide.....	12
1.5.	Verdauungstrakt vom Schwein, Rind und Pferd .....	13
1.5.1.	Aufbau .....	13
1.5.2.	Darmassoziiertes Immunsystem .....	13
1.6.	Anforderung an Tierfutter .....	13
1.7.	Gelpermeationschromatographie.....	14
1.7.1.	Universelle Kalibrierung.....	16
1.8.	Viskosität .....	16
1.8.1.	Viskosimetrische Molekulargewichtsbestimmung .....	18
1.9.	Zielsetzung der Arbeit.....	20
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1.	Material .....	21
2.1.1.	Verwendete Mikroorganismen .....	21
2.1.2.	Verwendete Enzyme .....	21
2.1.3.	Oligonucleotide.....	22
2.1.4.	Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.5.	Laborgeräte und Zubehör.....	24
2.1.6.	Chemikalien.....	25
2.2.	Methoden .....	26
2.2.1.	Scleroglucanpräparation .....	26
2.2.2.	Bestimmung der reduzierenden Enden nach Somogyi & Nelson .....	26
2.2.3.	Enzymatische Glucosebestimmung .....	27
2.2.4.	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	28
2.2.5.	Scherviskosität .....	30
2.2.6.	Polysaccharidbestimmung .....	30
2.2.7.	Proteinbestimmung (nach Lowry) .....	30
2.2.8.	SDS-PAGE und Gelfärbung .....	31
2.2.9.	Agarosegelelektrophorese.....	33
2.2.10.	Aufreinigung von DNA aus Lösungen und Agarosegelen .....	33
2.2.11.	Quantifizierung von DNA in Lösungen.....	34
2.2.12.	Western Blot .....	34
2.2.13.	Immunfärbung .....	34
2.2.14.	Herstellung chemischkompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	35
2.2.15.	Transformation von <i>E.coli</i> Zellen mittels Hitzeschock.....	35
2.2.16.	Enzymatische Hydrolyse .....	36
2.2.17.	pH-Wert Verschiebung.....	38
2.2.18.	Thermische Oberflächenhydrolyse .....	38
2.2.19.	Aufreinigung der Hydrolyseprodukte .....	39

2.2.20.	Fluoreszenzmarkierung von Scleroglucan.....	40
2.2.21.	Ultraschallabbau von Scleroglucan.....	40
2.2.22.	Kultivierung von <i>Trichoderma harzianum</i> .....	41
2.2.23.	Klonierung einer Glucanase in <i>E. coli</i> .....	43
2.2.24.	Glucanase Produktion in <i>E. coli</i> .....	49
2.2.25.	Fütterungsversuch.....	50
2.2.26.	Transport durch die Darmwand.....	51
2.2.27.	Abbau durch Mikroorganismen im Darmtrakt.....	53
2.2.28.	ELISA zur Bestimmung von Zytokinen.....	56
2.2.29.	ELISA zur Bestimmung von Immunglobulinen im Blutplasma.....	56
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
3.1.	Methodenentwicklung für den Nachweis der Hydrolyse von Scleroglucan.....	58
3.2.	Gelpermeationschromatographie.....	60
3.2.1.	Optimierung der Messbedingungen.....	60
3.2.2.	Kalibrierung über den RI-Detektor.....	63
3.2.3.	Universelle Kalibrierung.....	65
3.3.	Modifizierung von Scleroglucan.....	69
3.3.1.	Enzymatische Hydrolyse.....	70
3.3.2.	Enzymatische Hydrolyse mit AS 100.....	75
3.3.3.	Thermische Oberflächenhydrolyse.....	79
3.3.4.	Aufreinigung der Hydrolyseprodukte.....	82
3.3.5.	Fluoreszenzmarkierung des Scleroglucans.....	82
3.4.	Produktion einer Glucanase aus dem Schimmelpilz <i>Trichoderma harzianum</i> CECT 2413.....	83
3.4.1.	Kultivierung von <i>T. harzianum</i> .....	83
3.4.2.	Rekombinante Produktion in <i>E. coli</i> .....	91
3.5.	Versuche am Modellorganismus Schwein.....	96
3.5.1.	Zytokin-Spiegel bei der Aktivierung von Dendritischen Zellen durch Scleroglucan ....	96
3.5.2.	Fütterungsversuch.....	99
3.5.3.	Inkubation von Scleroglucan mit Darminhalt.....	101
3.5.4.	Transport durch die Darmwand.....	104
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>106</b>
4.1.	Molekulargewichtsbestimmung von Scleroglucan.....	106
4.2.	Modifizierung von Scleroglucan.....	109
4.3.	Rekombinante Produktion einer Glucanase.....	115
4.4.	Scleroglucan als Immunmodulator.....	118
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>6.</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
7.1.	Anhang.....	132



# 1. Einleitung

## 1.1. Polysaccharide

Polysaccharide können von lebenden Organismen wie Pflanzen, Algen, Tieren und Mikroorganismen produziert werden. Neben der DNA und den Proteinen stellen sie die drittgrößte Klasse der Biopolymere dar und weisen eine große Vielfalt chemischer Strukturen und physiologischer Funktionen auf. Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften ist ihre Anwendung in verschiedensten industriellen Bereichen wie zum Beispiel der Lebensmittelindustrie, Kosmetik, Agrarwissenschaft und in der Kraftstoffgewinnung weit verbreitet. Grundsätzlich sind Polysaccharide hochmolekulare Kohlenhydrate, die aus Zuckermonomeren aufgebaut sind, welche über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Bisher wurden ca. 40 Monosaccharide beschrieben, aus denen die verschiedensten Polysaccharide aufgebaut sind, allgemein gehören sie alle zu den Pentosen und Hexosen. Polysaccharide können als Homopolysaccharide oder Heteropolysaccharide vorliegen, im ersten Fall bestehen sie nur aus einem Monomer, im zweiten aus unterschiedlichen Monomeren. Die Homopolysaccharide sind oft D-Glucose verknüpft über  $\alpha$ - oder  $\beta$ -glykosidische Verbindung mit einem linearen oder verzweigten Rückgrat. Bei den Heteropolysacchariden können neben Zuckermonomeren auch Säuren oder anorganische Anionen eingebaut sein.

In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf einer Familie der Glucane, die zu den verzweigten  $\beta$ -(1,3)-D-Glucanen gehören. Es wird jedoch auch auf weitere industriell wichtige Vertreter anderer Glucanfamilien eingegangen.

### 1.1.1. Vorkommen

Die Polysaccharide werden von prokaryotischen und eukaryotischen Organismen zu unterschiedlichen Zwecken produziert. Ebenso vielfältig wie ihre Produzenten sind auch ihre Strukturen und Eigenschaften, wobei eine Klassifizierung aufgrund struktureller Besonderheiten vorgenommen wird: lineare, verzweigte oder zyklische Polysaccharide. Polysaccharide können Bestandteile von Zellen in der Zellwand sein oder auch sekretiert werden (sog. Exopolysaccharide).

$\beta$ -(1,3)-D-Glucane werden in Prokaryoten und Eukaryoten gefunden, auch dienen Getreide, Pilze, Meeresalgen und Hefen als Produzenten.

Als Zellwandbestandteile vorliegende Glucane von Pilzen und Hefen bestehen häufig aus einer Hauptkette aus (1,3)-verknüpften  $\beta$ -D-Glucopyranosoleinheiten mit einer (1,6) verknüpften Seitenkette.

Glucane aus Gerste, Hafer oder Weizen werden ebenfalls als Zellwandbestandteil gefunden. Sie weisen jedoch eine andere Struktur in ihrer Hauptkette auf, diese besteht aus einer Mischung von  $\beta$ -(1,3) und  $\beta$ -(1,4) glykosidischen Bindungen. Sie sind stark konzentriert in der Zellwand vom Endosperm und der Aleuronschicht von Gerste (Köksel et al., 1999), Hafer, Weizen, Hirse (Ramesh and Tharanathan, 1998) und weiteren Getreidesorten. Der Gehalt von  $\beta$ -Glucan variiert je nach Spezies zwischen 2 – 6 % des Trockengewichts (Zhang et al., 2002).

Prokaryoten produzieren hauptsächlich Exopolysaccharide (EPS). Bekannt ist zum Beispiel ein lineares  $\beta$ -(1,3)-D-Glucan welches von *Agrobacterium sp.* produziert und als Curdlan bezeichnet wird.

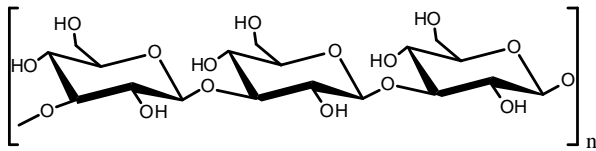
In Tabelle 1-1 sind beispielhaft Polysaccharide aufgezählt, die sowohl von Bakterien als auch von Hefen produziert werden.

Tabelle 1-1: Beispiele für Polysaccharide aus Bakterien und Hefen

Trivialname	Charakteristika	Organismus	Literatur
Dextran	$\alpha$ -1,6, $\alpha$ -1,4, $\alpha$ -1,3, $\alpha$ -1,2-D-Glucan DS = 2,7	<i>Streptococcus</i> <i>Acetobacter</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Lactobacillus</i>	(Sabatie et al., 1986) (Veljkovic et al., 1988)
Curdlan	$\beta$ -1,3-D-Glucan DS = 0	<i>Agrobacterium</i> <i>Alcaligenes</i> <i>faecalis</i> <i>Rhizobium trifolii</i>	(Lawford and Rousseau, 1989)
Xanthan	Rückrad $\beta$ -1,3-D-Glucan Seitenkette: Glucuronsäure, Mannose, Pyruvat DS = 0,2	<i>Xanthomonas</i>	(Torres et al., 1993) (Herbst et al., 1992)
Gellan	Tetrasaccharid-Einheit: D-Glucose, L-Rhamnose und D-Glucuronsäure (Verhältnis 1:2:1)	<i>Auromonas</i> <i>elodea</i> <i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i> E2	(Lobas et al., 1992)
Welan	Wie Gellan ohne L-Glycerat	<i>Alcaligenes spec.</i>	(Tako, 1990)
Pullulan	$\alpha$ -1,6, $\alpha$ -1,4-D-Glucan	<i>Auremonium</i> <i>pullulans</i>	(Schuster et al., 1993) (Boa and LeDuy, 1987)
Cineran	Grundkette: $\beta$ -1,3-D-Glucan Seitenkette: $\beta$ -1,6-D-Glucose	<i>Botrytis cinera</i>	(Pielken et al., 1990)
Schizophyllan	- " - DS 0,33	<i>Schizophyllum</i> <i>commune</i>	(Rau et al., 1990)
Scleroglucan	- " - DS 0,33	<i>Sclerotium sp.</i>	(Halleck, 1967)
Lentinan	- " - DS 0,2	<i>Lentinus edodes</i>	(Sasaki and Takasuka, 1976)

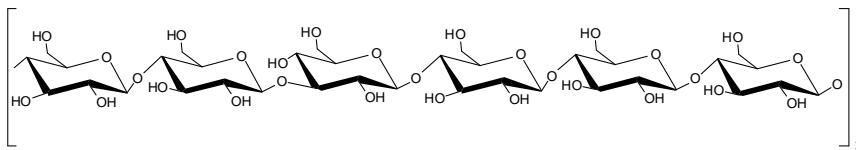
### 1.1.2. Eigenschaften

Das schon erwähnte lineare  $\beta$ -(1,3)-D-Glucan Curdlan weist keine Verzweigungen auf und ist das am einfachsten aufgebaute  $\beta$ -(1,3)-D-Glucan. Es ist ein neutrales, gelbildendes Polysaccharid (Harada et al., 1968). Das Molekulargewicht liegt bei durchschnittlich  $2 \cdot 10^6$  g/mol (Futatsuyama et al., 1999). Curdlan ist unlöslich in Wasser, Alkoholen und den meisten organischen Lösungsmitteln, löslich in verdünnter Base (0,25M NaOH), Dimethylsulfoxid (DMSO) und kann mit Ameisensäure konserviert werden. Die Gelbildung erfolgt temperaturabhängig. Ein schwaches Gel bildet sich nach Erhitzen auf 55 °C und anschließender Abkühlung. Bei Erwärmung auf 80 – 100 °C bildet sich ein stärkeres, festes, elastisches Gel. Durch Autoklavieren bei 120 °C verändert sich die molekulare Struktur und es kommt zur Ausbildung einer Tripelhelix, das dabei gebildete Gel kann nicht mehr geschmolzen werden (Zhang et al., 2002).



**Abbildung 1-1: Redundante Einheit von  $\beta$ -(1,3)-D-Glucan (z.B. Curdlan)**

Weitere lineare unverzweigte Glucane sind die  $\beta$ -(1,3)(1,4)-D-Glucane. Sie kommen hauptsächlich in der Zellwand von Getreidekörnern vor. In der linearen  $\beta$ -Glucankette sind die (1,3) Verbindungen durch unterschiedlich lange (1,4) Sequenzen unterbrochen (Skendi et al., 2003). Die Länge der Sequenz ist von Getreide zu Getreide unterschiedlich. Die (1,3) glykosidische Bindung beeinflusst die Löslichkeit und die Dichte der Packung der Kette (Woodward et al., 1983). Im Vergleich zu anderen Zellwandbestandteilen wie Zellulose oder Lignin lösen sich  $\beta$ -(1,3)(1,4)-D-Glucane sehr gut in Wasser. Das Molekulargewicht der  $\beta$ -Glucane variiert zwischen den unterschiedlichen Getreidearten. Aus Hafer gewonnene  $\beta$ -Glucane haben ein hohes Molekulargewicht ( $3 \cdot 10^6$  g/mol) im Vergleich zu denen aus Gerste ( $2,5 \cdot 10^6$  g/mol) (Lazaridou et al., 2003) oder denen aus Hirse ( $3,6 \cdot 10^4$  g/mol) (Ramesh and Tharanathan, 1998).



**Abbildung 1-2: Beispiel für ein gemischtes von  $\beta$ -(1,3)(1,4)-D-Glucan**

Als Beispiel für verzweigte Glucane sind die  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-Glucane zu nennen, die von Pilzen und Hefen produziert werden und als Tertiärstruktur eine Tripelhelix bilden. Sie weisen eine Grundkette aus  $\beta$ -(1,3) Glucoseeinheiten auf. An dieser Grundkette verzweigen sich (1,6)- $\beta$ -D-Glykosyleinheiten, deren Verzweigung regelmäßig oder zufällig verteilt sein kann (Nardin and Vincendon, 1989). Schizophyllan aus *Schizophyllum commune* und Scleroglucan aus *Sclerotium rolfsii* weisen eine überwiegend regelmäßige Verteilung auf. Hier befindet sich durchschnittlich an jedem dritten Glucosemolekül der Grundkette eine Seitenketteneinheit (DS 0,33). Lentinan aus *Lentinula edodes*, ein weiteres  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-Glucan, hat einen DS von 0,2. Diese  $\beta$ -Glucane besitzen alle ein hohes Molekulargewicht, aber haben durch ihre Struktur zugleich eine hohe Wasser Löslichkeit. Diese Löslichkeit ist auf die Seitenketten zurück zuführen und ist abhängig von der Häufigkeit und Länge der Seitenkette. Gleichzeitig ist in wässriger Lösung ein konzentrationsabhängiges hochviskoses Verhalten erkennbar.

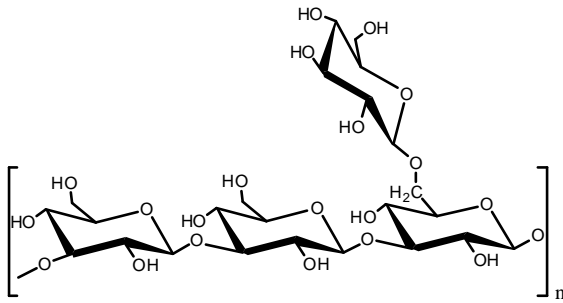


Abbildung 1-3: Redundante Einheit von  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-Glucane (z.B. Scleroglucan)

### 1.1.3. Anwendung

Die  $\beta$ -(1,3)-D-Glucane finden in einem breiten Spektrum Anwendung. So werden sie industriell in der Lebensmittelherstellung, in der Agrarwirtschaft, Kosmetik, als Therapeutikum und als Nahrungsergänzung verwendet. In der Lebensmittelindustrie werden die Glucane als unverdaubarer Überzug, als Futtermittel für Haustiere oder in kalorienarmer Nahrung angewendet.

Curdlan wird aufgrund seiner gelbildenden Eigenschaft gepaart mit Geschmacksneutralität, Farblosigkeit und Geruchlosigkeit als biologisches Verdickungsmittel und Geliermittel in der Nahrung verwendet. Das Fehlen von Verdauungsenzymen im oberen Verdauungstrakt für Curdlan begründet den Einsatz in der Entwicklung von kalorienarmer Nahrung (Takeuchi M., 1997, Uzuhashi, 2000, Ishikawa K., 2004). In Japan ist die Verwendung von Curdlan in Lebensmitteln etabliert, als Konsistenzgeber für Tofu, Bohnengelee und Fischpaste.

$\beta$ -Glucane werden auch aufgrund ihrer biologischen Aktivität in der medizinischen Forschung untersucht.  $\beta$ -Glucan von Bakterien, Hefen und Pilzen wird auch als Immunmodulator (eng. *biological response modifier* BRM) bezeichnet. Es konnte für unlösliche Ballaststoffe eine Abnahme der Darmdurchgangszeit (Shimotoyodome et al., 2001), Prävention gegen Darmträgheit, Verminderung von kolorektalem Karzinom (Bingham, 1990, Faivre and Bonithon-Kopp, 1999) und eine Produktion von kurzkettigen Fettsäuren (Karppinen et al., 2000, Velázquez et al., 2000) gezeigt werden. Für lösliche Ballaststoffe und insbesondere  $\beta$ -(1,3)(1,4)-D-Glucane konnten positive Effekte auf den Cholesterinspiegel im Blut (Kahlon T. S. , 1993, Behall et al., 1997), Abnahme von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie in Bezug auf die Kontrolle von Diabetes (Braaten et al., 1994a, Braaten et al., 1994b, Frost et al., 1999), Verminderung von Risikofaktoren für degenerative Erkrankungen wie Adipositas (Bourdon et al., 1999), Hyperlipidämie (Burley et al., 1987), Hypercholesterinämie (Maki et al., 2003), Herz-Kreislaufkrankungen (Keogh et al., 2003), Krebs (Sier et al., 2004), Hypertonie (Anderson, 1983) und bei der Unterstützung des Wachstums der Darmflora (Crittenden et al., 2002) gezeigt werden.

Die von Prokaryoten produzierten Exopolysaccharide werden zum Beispiel als Virulenzbestimmungsgröße bei tierischen Krankheitserregern herangezogen. Viele EPS sind verantwortlich für pathogene und symbiotische Interaktionen zwischen Bakterien und Pflanzen und spielen auch eine Rolle bei der Assoziation zwischen Bakterien und biotischen bzw. abiotischen Oberflächen und Matrixkomponenten in bakteriellen Biofilmen (Sutherland, 2001a). Eine große Anzahl von EPS finden auch Anwendung in der industriellen Produktion als Geliermittel und Emulgator (z. B. Xanthan) (Sutherland, 2001b).

## **1.2. Schizophyllan / Scleroglucan**

Schizophyllan und Scleroglucan ist die Bezeichnung für strukturell ähnliche Glucane, die von filamentös wachsenden Pilzen produziert werden. Schizophyllan wird von *Schizophyllum commune* gebildet, welcher zur Gattung Schizophyllum gehört und zur Klasse der Basidiomyceten. Scleroglucan wird von mehreren Vertretern der Sclerotia gebildet. Zwei der industriell wichtigsten Vertreter sind *Sclerotium rolfsii* und *Sclerotium glucanicum*. *Sclerotium rolfsii* (*Athelia rolfsii*) gehört zu der Klasse der Agaricomycetes.

### **1.2.1. Funktion und Wirkung**

Schizophyllan und Scleroglucan gehören beide zu den  $\beta$ -(1,3)(1,6)-D-Glucanen. Das Molekulargewicht variiert je nach Aufarbeitungsmethode, wurde mittels Lichtstreuung ermittelt und liegt zwischen  $6 - 12 \cdot 10^6$  g/mol (Rau et al., 1990, Pretus et al., 1991, Stokke et al., 1992). Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, dass beide Polymere eine tripelhelikale Struktur ähnlich der von Curdlan besitzen (Bluhm et al., 1982). In wässriger Lösung kommt es zur Bildung der Tripelhelix, wobei die aus Glucose bestehende (1,6)- verknüpften Seitenketten nach außen zeigen (Lecacheux et al., 1986). Diese Struktur kann auf unterschiedliche Weise aufgehoben werden: Lösen des Glucans in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder durch Erhitzen auf über 135 °C (Yanaki et al., 1985). Durch das Anheben des pH-Wertes von pH 6 auf pH 12 und einem anschließenden Absenken zurück auf pH 6 kommt es zur Ausbildung von zufälligen Ringstrukturen (Stokke et al., 1992), welche durch eine deutliche Abnahme der Viskosität zu erkennen sind (Rau, 1997). In der Abbildung 1-4 sind die von der Behandlung abhängigen Strukturen der Glucane graphisch aufgezeigt.

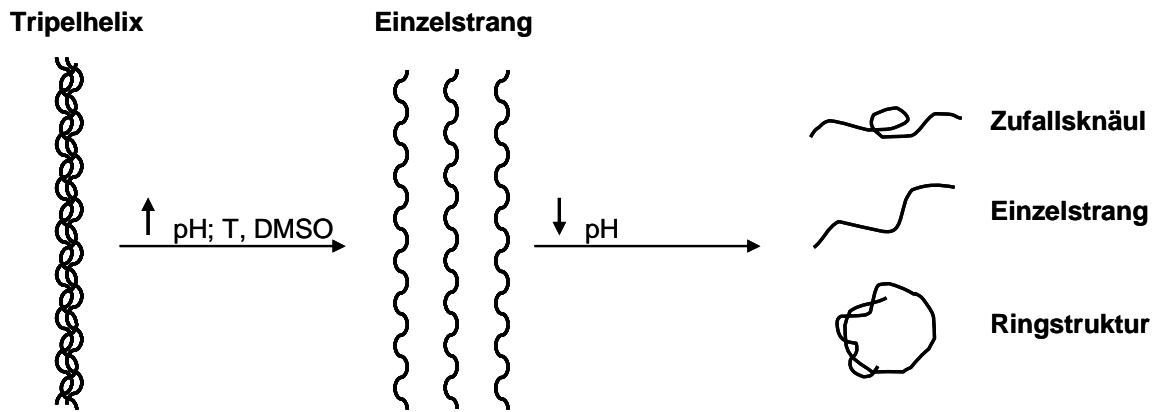


Abbildung 1-4: Mögliche Strukturen von Scleroglucan und Schizophyllan in wässriger Lösung.

Scleroglucan und Schizophyllan zeigen eine reversible Viskositätsabnahme bis zu einer Scherrate  $\leq 40.000 \text{ s}^{-1}$ . Das pseudoplastische Fließverhalten folgt dem Gesetz nach Ostwald und de Waele. Bei doppeltlogarithmischem Auftragen der Scherviskosität über der Scherrate, entsteht ein linearer Zusammenhang. Die Steigung dieser Geraden ist dem Fließindex proportional, der ein Maß für die Pseudoplastizität ist (Haarstrick and Rau, 1993).

Scleroglucan und Schizophyllan können als nahezu identisch angesehen werden (Borchers et al., 2004). Aus diesem Grund finden beide Polymere oft in den gleichen industriellen und technischen Bereichen Anwendung. Eine sehr vielversprechende technische Anwendung für Scleroglucan und Schizophyllan zeigte sich in einer Versuchsreihe, in der 140 Polymere auf ihre Eignung für die Polymerflutung von Nordseeölréservoir getestet wurden (Brigand, 1993). Das Scleroglucan hatte nach 500 Tagen bei  $90^\circ\text{C}$  in Meerwasser nur einen Verlust von 10 % der Viskosität. Schizophyllan, welches ebenfalls eine hohe Stabilität der Viskosität gegenüber hohen Scherraten, Temperaturen und Salzkonzentrationen aufweist, ist wie das Scleroglucan für die Polymerflutung geeignet (Rau et al., 1992). In hoch aufgereinigter Form wird Scleroglucan in der Lebensmittelindustrie unter anderem als Beschichtungs- und Geliermittel, sowie als Stabilisator in Tiefkühlprodukten eingesetzt. In der Kosmetikindustrie findet Scleroglucan Anwendung in Haarsprays und in verschiedenen Hautpflegeprodukten. Schizophyllan findet zum Beispiel speziell Anwendung in Cremes, die zur Hautregeneration nach dem Sonnenbad verwendet werden (Mok et al., 1999). Auch konnte für Scleroglucan und Schizophyllan der Effekt der immunmodulatorischen (BRM) Wirkung nachgewiesen werden (Pretus et al., 1991). Im Vergleich zu anderen EPS sind die beiden Homopolymere effektiver und zeigen zudem eine Antitumorwirkung. Es konnte auch der Einfluss auf die Anzahl und die Funktion von Makrophagen und dendritischen Zellen gezeigt werden (Pretus et al., 1991, Bimczok et al., 2009).

Scleroglucan und Schizophyllan sind für die Pilze nützlich hinsichtlich Anhaftung an Oberflächen und als Schutzfunktion vor Umwelteinflüssen. Es bildet eine adhesive Glykocalyx, die die Zelle umgibt und den Transfer von biodegradativen Enzymen und Säuren (Pathogenitätsfaktoren) nach außen ermöglicht, aber den Pilz gleichzeitig vor Abwehrstoffen der Pflanzen ins Zellinnere schützt. Zusätzlich bietet das Polymer Schutz bei Umweltstress, wie beispielsweise Austrocknung oder osmotischem Druck. Des Weiteren spielt Scleroglucan als Energiespeicher eine Rolle. Hydrolysierende Enzyme, die unter anderem auch von *Sclerotium*-arten produziert werden, können Scleroglucan in seine Glucosebausteine zerlegen, wenn keine anderen C-Quellen in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

### **1.2.2. Unterschiede**

Wie schon erwähnt können Scleroglucan und Schizophyllan als nahezu identisch angesehen werden (Borchers et al., 2004), jedoch bestehen Unterschiede im Molekulargewicht und der Gelbildung.

Für Scleroglucan wurden Molekulargewichte von  $2,9 \cdot 10^6$  g/mol bei Gewinnung aus *Sclerotium rolfii* und von  $1,4 \cdot 10^6$  g/mol aus *Sclerotium glaucum* nachgewiesen (Kulicke et al., 1997). Für Schizophyllan aus *Schizophyllum commune* liegt das Molekulargewicht im Bereich von ca.  $5,7 \cdot 10^6$  g/mol (Lecacheux et al., 1986) oder, wie von (Yanaki et al., 1985) gezeigt, in einem etwas größeren Bereich von  $6 \cdot 10^6$  g/mol. Somit besitzt Schizophyllan zwar die gleiche Struktur wie Scleroglucan, weist allerdings ein etwas höheres Molekulargewicht auf.

Für die Beschreibung der Gelbildung von Scleroglucan und Schizophyllan bestehen Unterschiede im Bezug auf die Bildung von thermoreversiblen Gelen. Untersuchungen zeigten das Scleroglucan ab einer Temperatur von 7 °C Gele bildet (Bluhm et al., 1982) und Schizophyllan ab einer Temperatur von 5 °C (Bot et al., 2001).

## **1.3. $\beta$ -Glucanase**

$\beta$ -Glucanasen spalten  $\beta$ -glycosidisch verknüpfte und glucosehaltige Polysaccharide und werden von Organismen aus den verschiedensten Überlebensstrategien produziert.

### **1.3.1. Vorkommen und Eigenschaften**

$\beta$ -Glucan hydrolysierende Enzyme wurden in vielen Organismen gefunden: in Pilzen, Bakterien, Archea, Algen, Mollusken und höheren Pflanzen (Stone and Clarke, 1992, Pitson



et al., 1993). Diese Enzyme gehören zu der Gruppe der O-glykosidischen Hydrolasen (EC 3.2.1), da sie die Hydrolyse von glykosidischen Bindungen katalysieren.

Die Funktion der  $\beta$ -Glucanasen ist abhängig von ihrer Quelle bzw. dem Produzenten. In Pflanzen bilden diese Enzyme eine Art Abwehrmechanismus gegen Pilzpathogene (Mauch et al., 1988, Grenier et al., 1993) und spielen bei der Zelldifferenzierung eine Rolle (Fincher, 1989, Bucciaglia and Smith, 1994). In Bakterien dienen die Glucanasen hauptsächlich als Hilfe bei der Ernährung der Bakterien (Watanabe et al., 1992).

Die Funktionen der Glucanasen aus Pilz und Hefe ist sehr vielfältig. In dieser Arbeit wird hauptsächlich mit den Enzymen aus diesen Organismen gearbeitet. Aus diesem Grund wird im Folgenden besonders auf die Funktion dieser Glucanasen eingegangen. Es existieren extrazelluläre und an die Zellwand assoziierte Glucanasen (Mouyna et al., 2002). Die zellwandassoziierten Glucanasen spielen eine wichtige Rolle bei morphogenetischen Prozessen (Adams, 2004).

Beim Zellwandwachstum spielt die Bedeutung des Gleichgewichts zwischen Hydrolyse und Erweiterung der bestehenden Zellwand eine wichtige Rolle. So wurde bei *Sclerotium rolfii* beobachtet, dass eine teilweise Hydrolyse bestimmter Zellwandbereiche es ermöglicht, neues Zellwandmaterial einzufügen, ohne die allgemeine Integrität zu gefährden (Kritzman et al., 1978). Eine weitere wichtige abbauende Funktion kommt den  $\beta$ -Glucanasen bei der Autolyse von Pilzzellen zu. Unmittelbar vor der Autolyse wird eine verstärkte Produktion von  $\beta$ -Glucanasen festgestellt.

Unter Glucosemangel kommt es zur verstärkten Produktion von  $\beta$ -Glucanasen, die das extrazelluläre  $\beta$ -Glucan abbauen und damit wieder Glucose für das Wachstum bereitstellen können. Dieses Phänomen wurde bei *Sclerotium glaucum* (Rapp, 1989, 1992b), *Phomaerochaete chrysosporium* (Bes et al., 1987) und *Botrytis cinerea* (Stahmann et al., 1992, Stahmann et al., 1993) beobachtet.

Mitglieder der Gattung *Trichoderma* sind antagonistisch zu anderen Pilzen, darunter sind auch einige pflanzenpathogene Arten. Mehrere Stämme produzieren  $\beta$ -(1,3)- und  $\beta$ -(1,6)-Glucanasen, die sehr effektiv Zellwände anderer Pilze hydrolysieren (De la Cruz et al., 1995c, Lora et al., 1995b, Thrane et al., 1997, Vázquez-Garcidueñas et al., 1998).

### 1.3.2. Hydrolyse

Die  $\beta$ -Glucanasen wurden systematisch von der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ (IUBMB) klassifiziert. Die Einteilung erfolgt nach der  $\beta$ -glykosidischen Bindung, die sie hydrolysieren. Bei dieser Klassifizierung werden die strukturellen

Eigenschaften des Enzyms nicht berücksichtigt. Es erfolgt eine Unterteilung in zwei Hauptgruppen, die Endo- und Exoglucanasen. Die Exoglucanasen spalten einzelne Glucosemoleküle vom nicht reduzierenden Ende. Das führt dazu, dass letztlich nur Glucose als Hydrolyseprodukt entsteht (Reese, 1977, Yamamoto and Nevins, 1983). Wenn nur die Exo- $\beta$ -(1,3)-Glucanase-Aktivität vorhanden ist und die  $\beta$ -(1,6)-Glucanase fehlt, kann dies zu dem Hydrolyseprodukt Gentiobiose führen (Pitson et al., 1993). Endoglucanasen spalten  $\beta$ -Bindungen zufällig entlang der Polysaccharidkette und führen zu kleineren Molekulargewichtsfractionen (Reese and Mandels, 1959).

Eine weitere Einteilung orientiert sich an den Faltungseigenschaften des Enzyms. Hier tritt die Aminosäuresequenz in den Vordergrund. Bei dieser Klassifizierung werden alle glykosidischen Hydrolasen berücksichtigt und nicht nur die  $\beta$ -Glucanasen. Bei der Einteilung nach CAZY (Carbohydrate active enzymes) erfolgt die Gruppierung der  $\beta$ -Glucanasen in bestimmte Familien (Bourne and Henrissat, 2001). So sind einige Exo- $\beta$ -(1,3)-Glucosidasen gleich verschiedenen Familien zugeordnet, wie die E.C.3.2.1.58. Sie ist in den Familien 3,5,17 und 55 zu finden. Die Endo  $\beta$ -(1,3)-Glucosidase (E.C.3.2.1.39) ist ebenfalls in den Familien 17 und 55 zu finden, jedoch zusätzlich noch in den Familien 16, 64 und 81.

Wie schon beschrieben produzieren einige Organismen Glucanasen. Aufgrund der Vielfältigkeit wird im Folgenden nur auszugsweise auf ausgewählte Glucanasen aus Bakterien und Pilzen eingegangen.

Sehr viele  $\beta$ -Glucanasen aus Bakterien und Archaea lassen sich aufgrund ihrer tertiären Struktur (jellyroll  $\beta$ -sandwich-Faltung) der Familie 16 der Glycosylhydrolasen zuordnen (Bauer et al., 1998, Planas, 2000, Hong et al., 2008, Ilari et al., 2009). Dies definiert jedoch nicht die Substratspezifität (Ilari et al., 2009).

## **1.4. Immunsystem**

Der menschliche Körper ist einer Vielfalt von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten ausgesetzt, gegen die er sich zur Wehr setzen muss. Den Großteil dieser Aufgabe übernimmt das Immunsystem. Um diese effizient ausführen zu können, besteht das Immunsystem aus zwei Bereichen: dem angeborenen und dem adaptiven (erworbenen) Immunsystem. Das adaptive Immunsystem ist ausschließlich bei Wirbeltieren zu finden. Es hat sich in der Evolution erst spät, vor ca. 500 Millionen Jahren, entwickelt. Dagegen ist das angeborene Immunsystem oder Teile davon bereits bei Schwämmen und bei Pflanzen zu finden (Louis Du Pasquier, 2006).

### Das angeborene Immunsystem

Die erste Barriere bei Wirbeltieren gegen Pathogene ist eine physikalische wie z. B. Haut oder Lungen- und Darmepithel. Die Epithelien des Darms und der Lunge sind zudem mit einer Schleimschicht bedeckt. Diese verhindert, dass sich die Krankheitserreger an das Epithel anheften können und enthält Substanzen, die Pathogene abtöten oder ihr Wachstum hemmen.

Durchbricht ein Pathogen die physikalische Barriere, erkennt das angeborene Immunsystem Moleküle, die in vielen Pathogenen (pathogenassoziierte Immunstimulanzen) aber nicht im Wirt vorkommen. Die Antworten des Immunsystems sind Entzündungsreaktion und Phagozytose. Die verschiedenen pathogenassoziierten Immunstimulanzen werden von mehreren Arten von Rezeptoren im Wirt erkannt und als Mustererkennungsrezeptor bezeichnet. Dabei gibt es sowohl lösliche Rezeptoren, die sich im Blut befinden, als auch membrangebundene. Zu den löslichen Rezeptoren gehören Komponenten des Komplementsystems.

Die membrangebundenen Rezeptoren befinden sich an der Zelloberfläche der Wirtszellen. Dazu gehören Mitglieder der Toll-like-Rezeptorfamilie (TLR), die Skavengerezeptoren und Mannoserezeptoren (Fraser et al., 1998). Die Zelloberflächenrezeptoren leiten die Phagozytose ein und/oder stimulieren ein Genexpressionsprogramm, um die angeborene Immunantwort auszulösen.

### Das adaptive Immunsystem

Das angeborene Immunsystem dient als erste Verteidigungslinie, ist aber auch essentiell für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort. Die adaptive Immunantwort ist hoch spezifisch und stellt einen lang anhaltenden Schutz dar.

Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind die Lymphocyten. Sie lassen sich in zwei unterschiedliche Klassen von Lymphocyten einteilen, die B-Zellen und die T-Zellen. Dabei erfolgt die Differenzierung der B-Zellen im Knochenmark und die der T-Zellen im Thymus. Beide entwickeln sich aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, sie sind jedoch für verschiedene Immunantworten verantwortlich. Die B-Zellen sind für die Antikörper-Antwort verantwortlich, die auch als humorale Immunantwort bezeichnet wird. Zu Plasmazellen differenzierte B-Zellen sezernieren Antikörper, die durch die Blutbahn zirkulieren und auch in andere Körperflüssigkeiten gelangen können wie Tränenflüssigkeit und Muttermilch. Deswegen werden sie als humoral bezeichnet (lat. Humor: Feuchtigkeit).

Die T-Zellen sind für eine zellvermittelte Immunantwort zuständig. Sie erkennen fremde Antigene auf der Oberfläche von Wirtszellen.

Beide Immunsysteme, das angeborene und das adaptive, beeinflussen und regulieren sich gegenseitig. Dies geschieht zum Teil durch direkten Zell-Zellkontakt. Wichtiger sind dabei aber vermutlich Botenstoffe, die von den verschiedenen Zellen des Immunsystems, aber auch von anderen Zellen des Körpers bei Infektionen sekretiert werden. Die wichtigste Klasse dieser Botenstoffe sind die Zytokine.

#### **1.4.1. Rezeptoren für Oligosaccharide**

Die Antwort auf zelluläre Interaktion der  $\beta$ -Glucane geht auf unterschiedliche Zelloberflächenrezeptoren zurück.  $\beta$ -Glucane vermitteln ihren Effekt über die Interaktion mit Membranrezeptoren an Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen (NK) Zellen. Der erste identifizierte Rezeptor wurde von Czop und Austen (1985) auf der Oberfläche von humanen Monozyten gefunden. Es ist ein Opsonin unabhängiger Rezeptor für die Aktivierung des alternativen Weges des Komplementsystems. Bis heute sind vier  $\beta$ -Glucanrezeptoren identifiziert: der Komplementrezeptor 3 (CR-3), Lactosylceramid, Scavengerrezeptor und Dectin-1.

Einige Studien weisen darauf hin, dass der Scavengerrezeptor auf Makrophagen  $\beta$ -Glucane erkennt. Der biochemische Nachweis dafür ist, dass bei dem Vorhandensein von löslichem  $\beta$ -Glucan der Scavengerrezeptor für weitere Interaktionen blockiert ist (Rice et al., 2002).

Der Dectin-1 Rezeptor (Borchers et al., 2004, Sletmoen and Stokke, 2008) agiert unter Umständen im Zusammenspiel mit den TLRs. Er ist auf dendritischen Zellen, Monocyten, Makrophagen, Neutrophilen und einem Teil der T-Zellen vorhanden und vermittelt als Immunantwort Phagozytose, Endocytose und oxidativen Burst. Die TLRs werden von myeloiden Zellen (Monocyten, Makrophagen und dendritischen Zellen), Epithelzellen, Mastzellen und Neutrophilen exprimiert. Dabei erkennen unter allen bekannten TLRs im besonderen Maß spezifisch, TLR-2 und TLR-4 die  $\beta$ -Glucane. Diese beiden Rezeptoren interagieren dabei gemeinsam mit Dectin-1 bzw. dem  $\beta$ -Glucan-Rezeptor, damit die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgreich ist und es zur Induktion von TNF- $\alpha$  kommen kann.

## **1.5. Verdauungstrakt vom Schwein, Rind und Pferd**

### **1.5.1. Aufbau**

Die Länge des Darmes beim Schwein wird mit dem 15-fachen der Körperlänge angegeben. Bei einem ausgewachsenen Tier entspricht dies 16-21 Meter. Die Unterteilung des Darmes erfolgt, wie bei allen Säugetieren, in Dünndarm und Dickdarm. Der Dünndarm ist unterteilt in Duodenum, Jejunum und Ileum, wobei der Dickdarm mit dem Caecum beginnt und sich dann im Colon ascendens mit dem Ansa spiralis coli (Grimmdarmspirale) bildenden Gyri centripetales und Gyri centrifugales fortsetzt. Nach der Ansa distalis coli folgen das Colon transversum und das Colon descendens. Einen dem Colon sigmoidum des Menschen und Wiederkäuers entsprechenden Darmabschnitt gibt es beim Schwein nur in den ersten Lebenswochen. Der Dickdarm endet mit dem Rectum und der Ampulla recti am Anus.

Die Darmwand besteht, von der luminalen zur serosalen Seite aus betrachtet, aus der Tunica mucosa (Schleimhaut) mit dem Epithelium mucosae (Epithel), der Lamina propria mucosae und der Lamina muscularis mucosae. Es folgt die Tela submucosae (Submukosa), die die Mukosa von der Tunica muscularis (Muskelschicht) mit dem Stratum circulare (Zirkulärmuskelschicht) und dem Stratum longitudinale (Längsmuskelschicht) abgrenzt. Den Abschluss bildet die Tunica serosa (Bauchfell) mit der Lamina propria serosae und dem Mesothelium serosae (Duncker, 2005).

### **1.5.2. Darmassoziiertes Immunsystem**

Das darmassoziierte Immunsystem (GALT) ist ein spezieller Teil des mukosaassoziierten Immunsystems (MALT), das in unterschiedlicher morphologischer Ausprägung an allen Schleimhautoberflächen des Körpers vorkommt. Das GALT setzt sich aus verschiedenen Kompartimenten zusammen: den intraepithelialen Lymphozyten (IEL), den frei in der Lamina propria vorkommenden Lymphozyten (LPL), den in der Lamina propria und in der Submukosa liegenden Lymphonoduli solitarii (Einzellymphknötchen) und den Peyerschen Platten (PP) (Nickel, 1999).

## **1.6. Anforderung an Tierfutter**

In der EG-Richtlinie 183/2005 werden die Hygiene- und Sicherheitsanforderungen für die gesamte Futtermittelkette festgeschrieben, eingeschlossen sind außerdem Anforderungen bei der Herstellung von Ergänzungsstoffen und Vormischungen. Die Richtlinie berücksichtigt die Herstellung und den Vertrieb von Futtermittelergänzungsstoffen, Vormischungen und

Futtermittelmischungen in einer globalen Futtermittelkette. Das entwickelte Standardverfahren berücksichtigt vor allem die korrekte Verwendung von Zusatzstoffen und Tierarzneimittel. Außerdem sind Grenzwerte für unerwünschter Produkte und Substanzen wie Schwermetalle, Pestizide oder Aflatoxine festgehalten und Maßnahmen zur Verhinderung einer Salmonellenkontamination von Tieren über Futtermittel enthalten. Die Verwendung von Antibiotika als Wachstumsförderer wurde 2006 in der EG endgültig verboten. Diese betraf die bis dahin noch zugelassenen folgenden 4 Antibiotika:

- Monensin-Natrium, das in der Rindermast verwendet wurde,
- Salinomycin-Natrium, das für Ferkel und Mastschweine verwendet wurde,
- Avilamycin das in der Schweine-, Ferkel-, Hähnchen- und Truthahnmast verwendet wurde,
- Flavophospholipol, das für Kaninchen, Legehennen, Masthähnchen, Truthähne, Ferkel, Schweine, Kälber und Mastrinder verwendet wurde.

## 1.7. Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) wird auch als Größenausschlußchromatographie (engl. *size exclusion chromatography* SEC) bezeichnet. Die GPC ist eine spezielle Methode der Fest-Flüssig-Durchflussschromatographie. Dabei wird die feste Phase als stationäre Phase bezeichnet und besteht in den meisten Fällen aus einer Trennsäule, die mit porösen Gelen gepackt wird. In der flüssigen Phase (mobile Phase) sind die zu untersuchenden Polymere gelöst.

Mit Hilfe der GPC ist es möglich die mittlere Molmasse, die Molmassenverteilung und die Verunreinigungen einer Polymerprobe zu bestimmen. Die GPC kann sowohl präparativ als auch analytisch verwendet werden. Heutige moderne Anlagen und deren Softwaresteuerung zur Auswertung und Messung ermöglicht eine komfortable Nutzung. Ein bestehender Nachteil der GPC ist, dass es sich um eine Relativmethode handelt, das bedeutet, dass für jedes Polymer bzw. Trennproblem eine eigene Kalibrierung erfolgen muss.

Die Trennung der Moleküle in der GPC erfolgt nach ihrer Größe im verwendeten Lösungsmittel, die Trennung ist daher abhängig vom hydrodynamischen Volumen. Für eine erfolgreiche Messung dürfen keine Wechselwirkungen zwischen dem zu untersuchenden Stoff und der stationären Phase auftreten. Das makroporöse Trenngel besteht aus kugelförmigen Teilchen etwa gleicher Korngröße (6-10 µm) und die Gelteilchen besitzen eine definierte Porenweite. Gelöste Makromoleküle können, abhängig von ihrem

hydrodynamischen Volumen, in die Poren eindringen und werden so beim Durchfließen der Trennsäule zeitlich zurückgehalten. Moleküle, die zu groß sind um in die Poren einzudringen, fließen unverzögert durch die Trennsäule und werden als erstes eluiert. Dieses Elutionsvolumen wird als Totvolumen bezeichnet und entspricht der Ausschlußgrenze. Sehr kleine Moleküle, die in das gesamte Porenvolumen eindringen, verlassen ebenfalls ungetrennt, jedoch als letztes, die Trennsäule. Dies entspricht dem maximalen Elutionsvolumen. Eine Trennung findet nur innerhalb der Elutionsgrenzen statt.

In Abbildung 1-5 ist schematisch das Grundprinzip der GPC dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die großen Makromoleküle (rot) vor den kleineren Makromolekülen (blau und grün) eluieren.

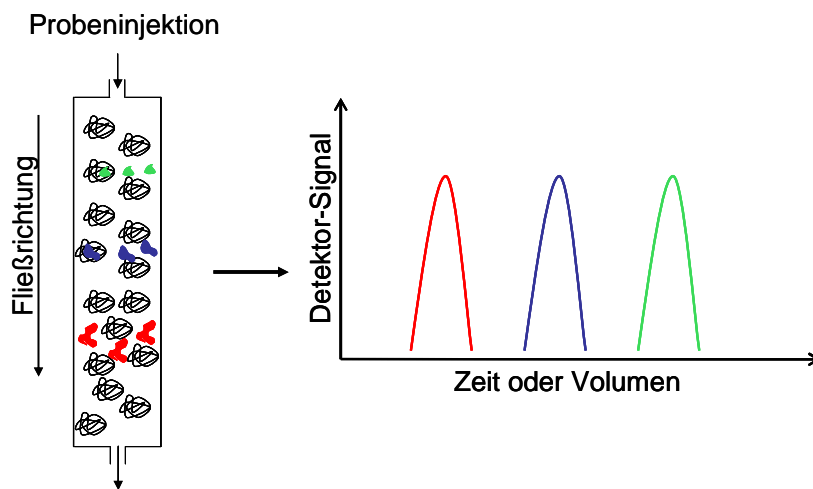


Abbildung 1-5: Trennprinzip der GPC

Ein so erhaltenes Chromatogramm, welches durch das Durchfließen des Eluats durch einen Konzentrationsdetektor entsteht, zeigt den Bezug des Molekulargewichts ( $M$ ) zum Elutionsvolumen ( $V_e$ ).

$$(M) = f(V_e)$$

Zwischen der Molmasse und dem Elutionsvolumen besteht ein allgemeiner Zusammenhang:

$$\lg(M) = f(V_e)$$

Eine Kalibrierung eines chromatographischen Systems kann über monodisperse Standardproben mit bekannter Molmasse erfolgen. Dabei sollte der Standard der zu untersuchenden Substanz identische oder möglichst ähnliche hydrodynamische Volumina aufweisen. Das Erstellen einer Kalibrierfunktion ermöglicht eine Transformation in die Molmassenverteilungsfunktion. Hierzu wird das Chromatogramm in  $i$  äquidistante Streifen geteilt und zu jedem Elutionsvolumen  $V_e^i$  die entsprechende Molmasse bestimmt.

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^f N_i M_i}{\sum_{i=1}^f N_i}$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^f N_i M_i^2}{\sum_{i=1}^f N_i M_i}$$

### 1.7.1. Universelle Kalibrierung

Existieren für ein Polymer, von welchem die Molekulargewichte bestimmt werden sollen, Standards mit einem eng verteilten Molekulargewicht kann das Elutionsvolumen der Probe direkt über die Kalibrierung bestimmt werden. Ist dieses nicht der Fall, kann mit Hilfe der universellen Kalibrierung eine Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgen. Benoit entwickelte eine Methode zur Bestimmung von Molekulargewichten ( $M_w$ ), wenn keine geeigneten Standards vorhanden sind. Die von Benoit entwickelte Methode beruht auf der Annahme, dass das hydrodynamische Volumen  $V_h$  proportional zu der intrinsischen Viskosität  $[\eta]$  und der Molmasse  $M$  ist, d. h. für zwei Polymere, die bei einem gleichen Elutionsvolumen eluieren gilt:

$$[\eta]_1 * M_1 = [\eta]_2 * M_2$$

Unter Verwendung der Mark-Houwink Beziehung

$$[\eta] = K * M^a$$

ist es möglich, dass Molekulargewicht der Polymerart 1 in das Molekulargewicht einer anderen Polymerart 2 umzurechnen.

$$\lg M_2 = \frac{1}{1 + a_2} \lg \frac{K_1}{K_2} + \frac{1 + a_1}{1 + a_2} \lg M_1$$

Für die Berechnung muss die Mark-Houwink-Konstante für beide Polymere bekannt sein.

## 1.8. Viskosität

Viskosität  $\eta$  ist der Fließwiderstand, der auftritt, wenn in einem fließenden Fluid Moleküle gegeneinander verschoben werden. Diese Relativbewegung der Moleküle kann bestimmt



werden. Fluide sind alle Materialien, die ein Fließvermögen aufweisen (Flüssigkeiten und Gase).

Die Definition der Scherviskosität erfolgt meistens über das Beispiel des Zwei-Platten-Modells (Abbildung 1-6). Scherviskosität tritt auf, wenn sich ein Fluid zwischen einer ruhenden Platte und einer Platte, die mit der Geschwindigkeit  $v_x$  bewegt wird, befindet. Die Kraft die benötigt wird um die bewegliche Platte pro Fläche zu ziehen, ist proportional zum Geschwindigkeitsgradienten (Scherrate  $\gamma$ ) und wird als Schubspannung  $\tau$  bezeichnet.

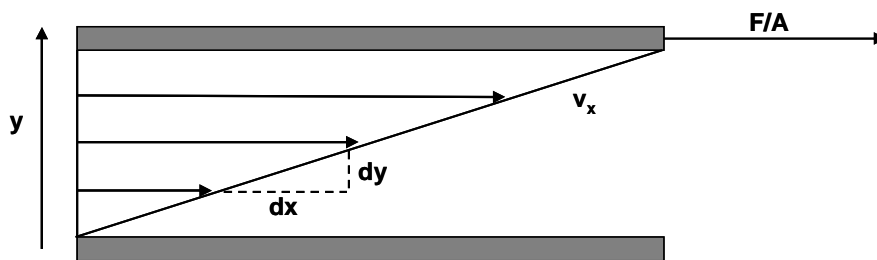


Abbildung 1-6: Laminare Strömung einer Flüssigkeit im Zwei-Platten-Modell

Aus der Abbildung 1-6 lässt sich folgende Berechnungsgrundlage schaffen:

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv_x}{dy} = \eta \gamma$$

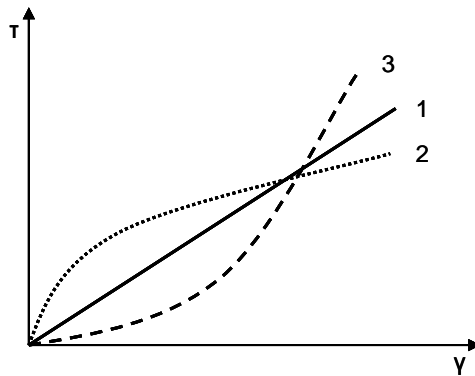
Die Strömung muss laminar erfolgen, es dürfen keine Turbulenzen (Verwirbelungen) auftreten. Das Fluid muss zu beiden Platten eine Wandhaftung haben, d. h. es dürfen keine chemischen Veränderungen erfolgen und die Homogenität der Probe sollte gegeben sein.

Bei der Bestimmung der Viskosität eines Fluids darf das Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Messung haben. Folgende Definitionen sind für eine Lösung, bei der das Lösungsmittel eine Viskosität von  $\eta_0$  besitzt, gebräuchlich:

relative Viskosität	$\eta_{\text{rel}} = \eta / \eta_0$
spezifische Viskosität	$\eta_{\text{sp}} = (\eta - \eta_0) / \eta_0 = \eta_{\text{rel}} - 1$
reduzierte Viskosität	$\eta_r = \eta_{\text{sp}} / c$

Allgemein wird in der Rheologie zwischen Fluiden unterschieden, deren Viskosität scherratenabhängig oder -unabhängig ist. Fluide, die scherratenunabhängig sind, werden als Newtonsche Flüssigkeiten beschrieben (z. B. Wasser). Die meisten Polymerlösungen weisen ein nicht newtonsches Verhalten auf, welches von ihrer komplexen Struktur herrührt. Dieses wird auch als Strukturviskosität beschrieben.

Des Weiteren erfolgt eine Einteilung nach ihrem scherratenabhängigen Verhalten. Nimmt die Viskosität mit zunehmender Scherrate ab, liegt ein pseudoplastischen Verhalten vor. Wenn die Viskosität mit zunehmender Scherrate ansteigt wird von dilatantem Verhalten gesprochen. In Abbildung 1-7 sind die unterschiedlichen Fließverhalten graphisch dargestellt.



**Abbildung 1-7: Abhängigkeit der Schubspannung (T) von der Scherrate (Y). 1 Newtonsches Verhalten; 2 Pseudoplastizität; 3 Dilatanz**

Für die Messung der Viskosität stehen mehrere Systeme zur Verfügung. Die Wahl des Viskosimeters richtet sich nach der zu untersuchenden Fragestellung. So kann ein Kapillarviskosimeter verwendet werden, um die Druckdifferenz zwischen dem reinen Lösungsmittel und der gelösten Probe zu bestimmen. Im Kugelfallviskosimeter wird die Zeit bestimmt, die eine Kugel definierter Größe benötigt um durch das Fluid zu fallen. Das Rotationsviskosimeter ist besonders für nicht-newtonsche Flüssigkeiten geeignet. Die Flüssigkeit befindet sich hier zwischen einer rotierenden und einer festen Platte. Es gibt unterschiedliche Ausführungsvarianten: Zylinder-Zylinder, Platte-Platte oder Kegel-Platte. Bei der Platte-Platte-Geometrie wird das übertragene Drehmoment zwischen beiden Platten in Abhängigkeit zur Scherrate gemessen.

### **1.8.1. Viskosimetrische Molekulargewichtsbestimmung**

Die Viskosität eines gelösten Polymers ist abhängig von der Konzentration des Polymers, dem Lösungsmittel und der Molmasse. Eine reine Bestimmung der Viskosität führt nicht zu der Molmasse des Polymers. Diese kann erst erfolgen, wenn ein Bezug zwischen der Molmasse  $M$  und der intrinsischen Viskosität  $[\eta]$  durch eine Kalibrierungsfunktion erstellt wird. Bei der GPC erfolgt eine Trennung von Molmassen aufgrund des hydrodynamischen Volumens  $V_h$ . Das hydrodynamische Volumen ist proportional zur intrinsischen Viskosität  $[\eta]$  und Molmasse eines Polymers. Nach der Einstein-Stoke Theorie kann die Molmasse einer

unbekannten Polymerprobe unabhängig von der Polymerarchitektur aus der intrinsischen Viskosität  $[\eta]$  bestimmt werden. Dabei wird ein Bezug zwischen der Molmasse  $M$  und der intrinsischen Viskosität  $[\eta]$  einer bekannten Polymerprobe erstellt:

$$M = [\eta]_{\text{std}} * M_{\text{std}} / [\eta]$$

Diese Beziehung wird als universelle Kalibrierung bezeichnet. Bei der konventionellen Kalibrierung wird der Logarithmus der Molmasse gegenüber dem Elutionsvolumen aufgetragen. Chemisch unterschiedliche Polymere haben unterschiedliche Kalibrierungsfunktionen. Bei der universellen Kalibrierung hingegen liegen alle auf einer Kurve. Hier wird der Logarithmus des Produkts aus Molmasse und intrinsischer Viskosität gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die Messung der Viskosität, gekoppelt an eine GPC-Anlage erfolgt über den Druckabfall entlang einer Kapillare, welcher proportional zur Viskosität des Eluenten ist. Die relative Viskosität  $\eta_{\text{rel}}$  gibt die Viskosität  $\eta$  eines gelösten Stoffes gegenüber der Viskosität  $\eta_0$  des Lösungsmittels an.

$$\eta_{\text{rel}} = \eta / \eta_0$$

Beim Lösen einer Makromolekularen Substanz kommt es zu einer Viskositätserhöhung die  $\eta - \eta_0$  entspricht. Die spezifische Viskosität  $\eta_{\text{sp}}$  ist daher definiert als:

$$\eta_{\text{sp}} = (\eta - \eta_0) / \eta_0$$

Die intrinsische Viskosität  $[\eta]$  ist als der Grenzwert des Quotienten aus der spezifischen Viskosität und der Konzentration  $c$  für eine unendliche Verdünnung definiert.

$$[\eta] = \lim (\eta - \eta_0) / (\eta_0 * c) = \lim \eta_{\text{sp}} / c$$

Damit bietet sich die Möglichkeit über die universelle Kalibrierung auch unbekannte Polymere zu charakterisieren.

## 1.9. Zielsetzung der Arbeit

Seit 2005 ist in der Europäischen Union die Verabreichung von Antibiotika im Tierfutter als Wachstumsfaktor für Masttiere verboten. Dieses Verbot öffnete den Markt für Tests von neuen möglichen Stoffen mit wachstumsfördernden Eigenschaften ohne Nebenwirkungen für den Konsumenten und das Tier. Scleroglucan, gebildet von *Sclerotium rolfsii*, gehört zu den  $\beta$ -Glucanen, für die verschiedenste Anwendungsmöglichkeiten beschrieben sind. Unter Anderem finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben über die immunstimulierende Wirkung von  $\beta$ -Glucanen in der Tierzucht. Daher wird das Scleroglucan auf seine Eignung als wachstumsfördernder Stoff in der Tierernährung getestet. Aus der Literatur geht hervor, dass die Faktoren Molekulargewicht und -verteilung, Verzweigungsgrad und Überstruktur die Aktivität der  $\beta$ -Glucane beeinflussen. Aus diesem Grund ist ein weiteres Ziel die Entwicklung eines Nachweissystems für die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von neutralen Polymeren und die Produktion von Scleroglucan-Größenstandards.

In der Literatur wurden einige Glucanasen mit Endo- und/oder Exo-Aktivität beschrieben, die bisher nicht an Scleroglucan getestet wurden. Aus diesem Grund werden verschiedene kommerzielle Enzyme auf ihre Aktivität hin getestet. Dabei wird ebenso die Produktion einer bereits beschriebenen Glucanase BGN13.1 durch Kultivierung des Pilzes *Trichoderma harzianum* als auch die Klonierung in *E.coli* zur Überproduktion der Glucanase untersucht um Scleroglucan regioselektiv zu hydrolysieren und definierte Molekulargewichtsfractionen herzustellen.

Neben dem enzymatischen Abbau wird der thermische Abbau an verschiedenen Oberflächen sowie der Abbau des Scleroglucans im Darm von unterschiedlichen Tieren untersucht.

Die immunstimulierende Wirkung von Molekulargewichtsfractionen wird *in vitro* an MoDC aus dem Schwein untersucht. Neben den *in vitro* Studien wird *in vivo* durch Fütterung verschiedener Konzentrationen von Scleroglucan und kommerziell erhältlichen  $\beta$ -Glucanen die Auswirkung auf den Immunglobulin-Titer im Tier untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Verwendete Mikroorganismen

Tabelle 2-1: Verwendeten Stämme

Name	Verwendung/Genotyp
T. harzianum DSMZ 63059	Produktion von Glucanasen
T. harzianum CECT 2413	Produktion von Glucanasen
<i>E. coli</i> BLR (DE3)	rekombinante Produktion des Gens BGN 13.1
<i>E. coli</i> XL1blue	Überprüfung der Klonierung des Gens BGN 13.1 in den jeweiligen Vektor
<i>S. rolfsii</i> (ATCC 15205)	Glucanproduktion

#### 2.1.2. Verwendete Enzyme

Die folgenden  $\beta$ -Glucanasen wurden von Erbslöh Geisenheim AG bezogen:

$\beta$ -Glucanase aus dem Stamm *Trichoderma harzianum*

$\beta$ -Glucanase aus dem Stamm *Trichoderma reesei*

$\beta$ -Glucanase aus dem Stamm *Penicillium funiculosum*.

Zudem wurde von der Firma Biopract GmbH Berlin ein Enzymmix mit der Bezeichnung CelluPract AS 100 (Batch-Nr. 2) für die Hydrolyse eingesetzt. Um das Enzym für die Hydrolyse verwenden zu können, wurden 3 g des in Pulverform vorliegenden CelluPract AS 100 in 30 mL deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gelöst und die Suspension für 1 h bei 4 °C auf dem Rotator gelöst. Anschließend wurde das Trägermaterial für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der vom Trägermaterial befreite Überstand wurde für die Hydrolyse verwendet.

Für weitere Hydrolysen wird die  $\beta$ -1,3-D-Glucanase aus *Helix pomatia* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) verwendet. Dieses Enzym hat eine angegebene Glucanaseaktivität von 0,5 - 1,5 Units/mg. Die optimalen Bedingungen liegen bei pH 5,0 und 37 °C.

Des Weiteren wird die  $\beta$ -Glucanase aus *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) für Hydrolysen verwendet. Dieses Enzym hat eine angegebene Glucanaseaktivität von 1 Unit/mg. Hier liegt die optimale Temperatur bei 55 °C und der optimale pH-Wert bei 6,0.

Auch die Laminarinase aus *Trichoderma species* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) wird für Hydrolysen verwendet. Dieses Enzym hat eine angegebene Glucanaseaktivität von 162 Units/g. Die optimale Temperatur liegt bei 37 °C und der optimale pH-Wert ist 5,0.

Die folgenden  $\beta$ -Glucanasen wurden von der Südzucker AG bezogen:

Optimash™ TBG von Genencor®

Optimash™ BG von Genencor®

Optimash™ NS von Genencor®

### 2.1.3. Oligonucleotide

**Tabelle 2-2: Primersequenzen**

Name	Sequenz
Forward_1 (f1)	5'-gcatcatgttgaagctcacg-3'
Reverse_1 (r1)	5'-caagatgttgagctcattcg-3'
BGN_mature_NheI_f (a)	5'-gtgagctagcttctattaccctaacatgg-3'
BGN_noCys_NotI_r (b)	5'-tgaagcgccgccaaagagttccaaagagcaac-3'
BGN_withCys_NotI_r (c)	5'-tgaagcgccgccagtagtataacgggcaacgtca-3'
mhet21_f1	5'-gagcggataacaattcccc-3'
MHET21_r1	5'-gcagccaactcagcttcc-3'

**Tabelle 2-3: Verwendete Enzyme für die Klonierung**

Name/Organismus	Hersteller
SAP (shrimp alkaline phosphatase, Alkalische Phosphatase aus der Krabbe)	NEB, Frankfurt am Main
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt am Main
RedTaq-Polymerase	Sigma, München
Trypsin	Sigma, München
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim

### 2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-4: Alphabetische Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung/Hersteller
Crimp-Deckel	Aluminium mit Septum, Wicom, Heppenheim
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dialysierschlauch	Ausschlussgrenze: 14 000 g/mol; Carl Roth, Karlsruhe
Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Filterpapier	GB 002, Schleicher & Schüll, Dassel
Mikro-Schraubröhrchen	2 mL Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten	Polypropylen Greiner bio-one, Frickenhausen
Objektträger	Thermo Scientific, Braunschweig
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen	10 cm, 15 cm Durchmesser; Greiner bio-one, Frickenhausen
PVDF Membran	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	1,5 mL, 2 mL; Sarstedt, Nümbrecht
Rollrandflasche	1,5 mL; Dedecker GmbH, Königswinter
Zentrifugenröhrchen	15 mL, 50 mL; Greiner bio-one, Frickenhausen Maxisorp, Nunc, Wiesbaden

### 2.1.5. Laborgeräte und Zubehör

Tabelle 2-5: Alphabetische Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autosampler	Merck HITACHI, LaChrom 7200
Blot-Apparatur TransBlot	SD Bio-Rad, München
Blutzuckermessgerät	Accutrend®Plus; Roche Diagnostics AG, Risch
Dialyseschlauch (14000 g/mol)	Carl Roth GmbH + Co®, Karlsruhe
Elektrophoresekammern Miniprotean	3 cell Bio-Rad, München
ELISA-Reader	Tecan Sunrise, Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer	Columbus Plus Tecan, Crailsheim
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4 LD plus Firma Christ, Osterode am Harz
Geldokumentation	Gel Jet Imager; Intas, Göttingen
Inkubator	HeraCell Heraeus, Hanau
Leitfähigkeitsmessgerät	Pure Water Tester (Model WA-100 ATC) der Marke Voltcraft®
Mischgerät	Vortex Genie 2 Scientific Industries
Pulsationsdämpfer	Scientific Systems Inc., Lo-Puls
Pumpe (GPC)	LaChrom 7100; Merck HITACHI
RI-Detektor	Shodex, RI-101
Rotationsviskosimeter	Haake Viskotester 550 ThermoElectron Cooperation
Säulenofen	LaChrom 7300; Merck HITACHI
Sintermetallfilter (10 µm)	Cr/Ni-Stahl, Firma GKN Sinter Metal Filter GmbH
Spectrophotometer	U-1100; HITACHI, Tokio
U50 Bioreaktor	Firma B. Braun, Melsungen
UV-Detektor	Merck HITACHI, LaChrom 7400
Vakuumtrockenschrank	VT 5042 EK; Firma Heraeus, Hanau
Viskositätsdetektor	Weg Dr. Bures, eta-1000
Wauxesha Kreiskolbenpumpe	Firma Intertechnik



### **2.1.6. Chemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien und Biochemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Fluka/Sigma-Aldrich (Neu-Ulm), MBI Fermentas (St. Leon Roth), Merck KGaA (Darmstadt), Riedel-deHaën AG (Sarstedt), Roche (Mannheim), BD (Sparks, USA), Carl Roth (Karlsruhe), AppliChemGmbH (Darmstadt), Pierce Perbio Science (Bonn) und Serva (Heidelberg).

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Scleroglucanpräparation

Das in dieser Arbeit verwendete Scleroglucan wird durch den Stamm *Sclerotium rolfsii* ATCC 15205 in einer Bioreaktorkultivierung produziert. Die Aufreinigung erfolgt durch Diafiltration. Nach der Aufreinigung wird das Produkt mit 5 g/L Ameisensäure stabilisiert.

Das diafiltrierte und stabilisierte Scleroglucan wird für die entsprechenden Versuche mit dH<sub>2</sub>O auf die gewünschte Konzentration gebracht.

Für Versuche bei denen eine Analyse mit der GPC erfolgen soll ist eine Dialyse gegen 0,1 g/L Natriumazid unter langsamen Rühren bei RT über mindestens 8 h vor Gebrauch erforderlich. Der Dialyseschlauch Visking (Artikelnummer: 0654.1; Typ: 27/32) wird vor seinem Gebrauch für 15 min in der Natriumazidlösung eingeweicht. Vor Beginn der Dialyse wird die Leitfähigkeit der Natriumazidlösung und der verdünnten Scleroglucanlösung bestimmt.

Nach mindestens 8 h erfolgt eine erneute Bestimmung der Leitfähigkeit. Ist ein Anstieg in der Leitfähigkeit der Natriumazidlösung und eine Verringerung in der Scleroglucanlösung zu messen, wird die Dialyse als erfolgreich betrachtet. Für die Dokumentation erfolgt die Bestimmung des pH-Wertes der Scleroglucanlösung.

### 2.2.2. Bestimmung der reduzierenden Enden nach Somogyi & Nelson

Mit dem von Somogyi und Nelson entwickeltem Test lässt sich das reduzierende Ende an einem Zuckermolekül (Somogyi, 1952) messen. Mit Hilfe dieses Tests kann der Hydrolysefortschritt bestimmt werden.

**Tabelle 2-6: Schwachalkalisches Kupferreagenz**

Substanz	Konzentration [g/L]
K-Na-Tatrat <sup>1)</sup>	12
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>1)</sup>	24
CuSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O <sup>1)</sup>	4
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>2)</sup>	180

<sup>1)</sup> in 300 mL dH<sub>2</sub>O gelöst

<sup>2)</sup> in 500 mL dH<sub>2</sub>O gelöst; für 30 min aufgekocht (Evaporation).

Anschließend werden beide Lösungen vereinigt und mit dH<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt. Nach einer Woche Lagerung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss ist die Lösung gebrauchsfertig.

**Tabelle 2-7: Arsenmolybdat-Reagenz**

Substanz	Konzentration [g/L]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> • H <sub>2</sub> O <sup>1)</sup>	50
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%-ig) <sup>2)</sup>	42 mL
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O <sup>2)</sup>	6

<sup>1)</sup> in 950 mL dH<sub>2</sub>O gelöst

<sup>2)</sup> in die gelöste Lösung <sup>1)</sup> gegeben.

Das Arsenmolybdat-Reagenz (Tabelle 2-7) wird bei Raumtemperatur für 3 Tage lichtgeschützt inkubiert und ist danach gebrauchsfertig. Um die hergestellten Reagenzien vor Lichteinwirkung zu schützen, werden die Vorratsflaschen mit Aluminiumfolie umwickelt.

150 µL Probe und 150 µL dH<sub>2</sub>O und 300 µL des schwach alkalischen Kupferreagenzes (Tabelle 2-6) werden in einem 2 mL Eppendorfgefäß vermischt (gevortext) und für 10 min in ein siedendes Wasserbad gegeben. Anschließend wird die Probe für 5 min in ein Eisbad gestellt. Nach Zugabe von 300 µL Arsenmolybdat-Reagenz (Tabelle 2-7) und 1 mL dH<sub>2</sub>O wird erneut gevortext, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 500 nm gegen einen Blindwert, bei dem anstatt Probe dH<sub>2</sub>O verwendet wird, vermessen. Die Kalibrierung wird mit Glucoselösungen der Konzentrationen 0,0625 g/L, 0,125 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L durchgeführt. Die Glucosestandards werden wie eine Probe behandelt. Daher wird vor der Messung ebenfalls eine 1 : 2 Verdünnung vorgenommen. Diese braucht nachher in der Auswertung nicht berücksichtigt zu werden.

### 2.2.3. Enzymatische Glucosebestimmung

Die enzymatische Glucosebestimmung erfolgt mit einem Blutzuckermessgerät. Aus diesem Grund muss jede Probe vorher mit 1 M Phosphatpuffer (pH 7) 1 : 2 verdünnt werden, um den notwendigen physiologischen pH-Wert zu erreichen. 15 µL der verdünnten Probe werden auf einen Glucoseteststreifen gegeben und vermessen. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgt über eine Glucosekonzentrationsreihe (0,4 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L und 6 g/L).

#### 2.2.4. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die GPC (Gelpermeationschromatographie) ist ein Analyseverfahren, bei dem eine Auftrennung der Substanzen nach dem hydrodynamischen Volumen ( $V_h$ ) erfolgt. Bei diesem Verfahren kann sowohl die Probe in ihrer Gesamtzusammensetzung (Substanz, Verunreinigung und Begleitstoffe) als auch der Eluent einen Einfluss auf die Trennung der Substanzen haben. Die Gelpermeationschromatographie ermöglicht die Auftrennung gelöster Stoffe nach ihrer Größe.

Die Messung erfolgt mit einem Brechungsindexdetektor (RI) und einem Viskositätsdetektor. Die Messkammern der Detektoren werden auf 35°C temperiert. Für die Trennung werden zwei hintereinander geschaltete Säulen verwendet und eine Vorsäule:

1. PSS Suprema 100 Å (PSS Polymer, Mainz);
2. PSS Suprema 30.000 Å (PSS Polymer, Mainz).

Mit diesen Säulen wird ein Molekulargewichtsbereich von 100 - 30.000.000 g/mol abgedeckt. Für die Bestimmung des Molekulargewichts des nativen Scleroglucans und des Scleroglucanhydrolysats hat sich 0,2 g/L  $\text{NaN}_3$  als Fließmittel als besonders geeignet herausgestellt. Das Laufmittel wird mit einer konstanten Geschwindigkeit (0,5 mL/min) durch die Säulen gepumpt. Zur Kalibrierung dienen Pullulane (PSS Polymer, Mainz) mit einem Molekulargewicht von 342 - 1.660.000 g/mol. Die Säulen werden in einem Ofen auf 75 °C temperiert. In der Abbildung 2-1 ist der Aufbau der verwendeten GPC-Anlage schematisch gezeigt. Wichtig ist, dass die Kalibrierung mit dem gleichen Laufmittel und der gleichen Fließmittelgeschwindigkeit erfolgt, wie die anschließende Messung.

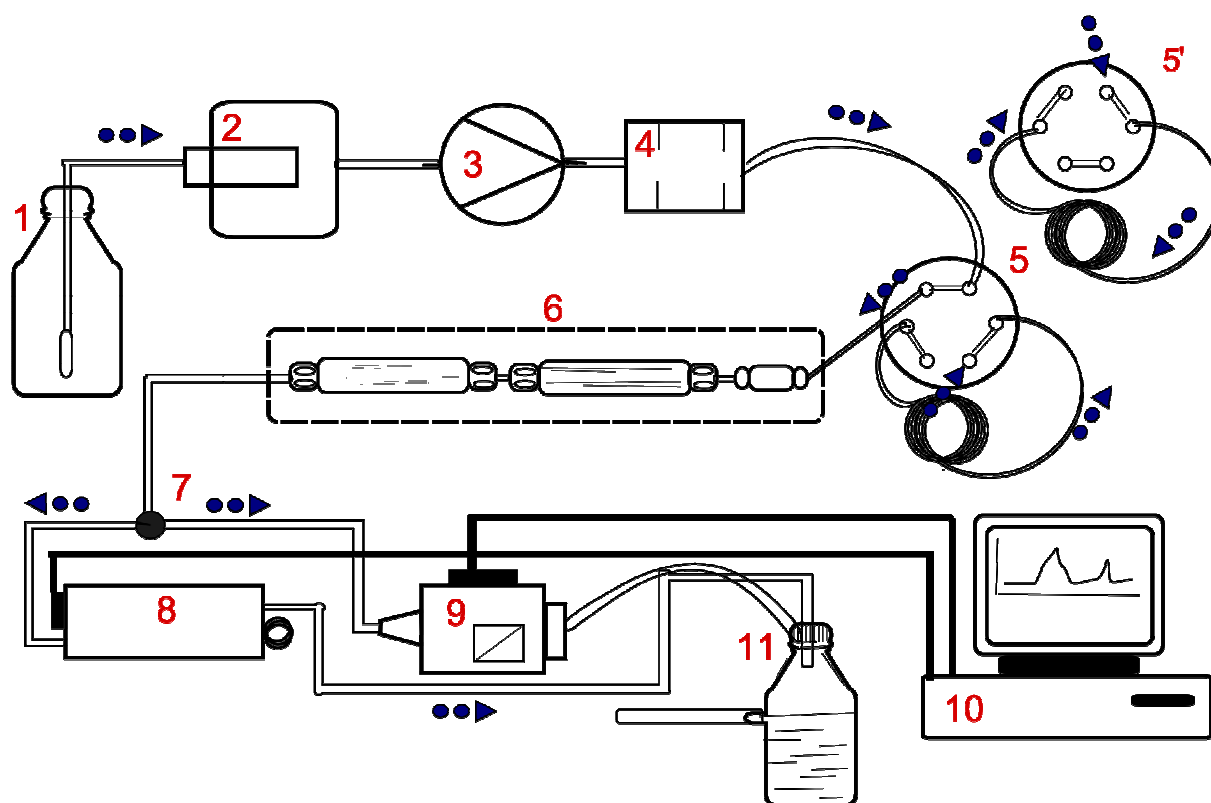


Abbildung 2-1: Aufbau der GPC-Anlage. 1 Behälter mit mobiler Phase, 2 Entgaser für die mobile Phase, 3 Pumpe, 4 Pulsationsdämpfer, 5 Umschaltventil für die Probenbeladung, 5' Umschaltventil für die Probeninjektion, 6 Säulenofen mit Säulen, 7 Split der mobilen Phase, 8 Viskositätsdetektor, 9 RI-Detektor, 10 Datenaufzeichnung, 11 Abfallbehälter

### Polymerprobenvorbereitung

Proben werden mit einer Glucan-Konzentration von höchstens 0,5 g/L verwendet. Die Proben werden entsprechend ihrer Konzentration mit Laufmittel verdünnt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation der Mischung für 5 min bei 13.000 Upm (Biofuge pico, Haereus). 1.400 µL Probengemisch werden in ein HPLC-Probenröhrchen (2 mL) gegeben und verschlossen.

### Pullulanstandardvorbereitung

Für eine optimale Erstellung einer Kalibrierfunktion werden die Pullulanstandards abhängig von ihrem Molekulargewicht in unterschiedlicher Konzentration gemessen (Tabelle 2-8). Die Standards werden dabei in Laufmittel gelöst und über Nacht bei RT in einem Überkopfschüttler gelöst. 1.400 µL werden in ein HPLC-Probenröhrchen (2 mL) überführt.

**Tabelle 2-8: Konzentration der Pullulanstandards (Injektionsvolumen 100µL)**

<b>Molekulargewicht [g/mol]</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
342, 1.080, 5.600, 11.200, 22.000	3
45.900, 106.000, 200.000, 380.000	1
710.000, 1.540.000	0,5

### **2.2.5. Scherviskosität**

Die Bestimmung der Scherviskosität erfolgt mit einem Rotationsviskosimeter (Haake Viskotester 550). Bei der verwendeten Messeinrichtung NV handelt es sich um ein Doppelspaltsystem. Es wird ein Probenvolumen von 9 mL verwendet. Gemessen wird mit einer Schertreppe von 0,1 bis 350 1/s bei einer konstanten Temperatur von 30 °C. Wenn sich ungelöste Partikel in der Probe befinden, müssen diese vorher abzentrifugiert werden.

### **2.2.6. Polysaccharidbestimmung**

Die gravimetrische Bestimmung des Polysaccharidgehalts einer Scleroglucanlösung erfolgt über eine Isopropanolfällung. 5 g wässrige Scleroglucanlösung werden mit 15 mL Isopropanol (98 %) versetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die gesamte Lösung wird in zuvor getrocknete und gewogene Metallbecher gegeben und bei 4 °C für 10 min mit 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird für mindestens 48 h bei 40 °C im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Die Metallbecher werden im Exsikator abgekühlt. Nach dem Abkühlen erfolgt ein erneutes Wiegen. Über die Gewichts Differenz wird der Polysaccharidgehalt bestimmt. Alle Bestimmungen werden im Duplikat durchgeführt.

### **2.2.7. Proteinbestimmung (nach Lowry)**

Die Bestimmung des Proteingehalts wird in den untersuchten Enzymmischungen und in anderen Proben nach Lowry durchgeführt. Bei dieser Methode wird durch die Bildung eines Komplexes der Kupferionen mit Peptidbindungen die Reduktion des hinzugegebenen Folin-Ciocalteu-Reagenzes ermöglicht. Diese Reduktion führt zu einer bläulichen Färbung.

Die verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

- A 200 mL 2%ige  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1 M NaOH gelöst % (w/v)
- B 100 mL 1%ige  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  % (v/v)
- C 100 mL 2%ige Na-K-Tartrat
- D 20 mL Folin-Reagenz (1:2 verdünnt, immer frisch angesetzt)

E      Gebrauchsreagenz: 50 mL A + 0,5 mL B + 0,5 mL C

0,1 mL Probe und 1 mL Lösung E werden sofort gut gevortext und für 5 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Danach wird 0,1 mL Lösung D hinzugegeben, erneut gevortext und für 30 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Die Extinktion wird bei 660 nm gegen einen Blindwert vermessen (0,1 mL dH<sub>2</sub>O + 1 mL Lösung E + 0,1 mL Lösung D). Die Kalibrierung wird auf die gleiche Weise durchgeführt. Dazu wird mit Hilfe von Rinderserumalbuminlösungen der Konzentrationen 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L und 250 mg/L eine Standardkalibriergerade erstellt.

### 2.2.8. SDS-PAGE und Gelfärbung

Die in den Enzymgemischen enthaltenen Proteine, die zur Hydrolyse eingesetzt werden, konnten mit Hilfe von SDS-haltigen (Sodium Dodecylsulfat) Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das im Gel sowie im Lauf- und vor allem im Probenpuffer enthaltene SDS kam dabei zum Einsatz, um die enthaltenen Proteine teilweise zu denaturieren und sie mit einer einheitlichen negativen Ladung zu versehen, so dass die Auftrennung ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht und nicht nach ihrer Ladung erfolgen konnte.

Vor der Beladung der Geltaschen werden 20 µL jeder Probe mit jeweils 5 µL 5x Lämmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für 5 min gekocht, so dass durch das enthaltene β-Mercaptoethanol auch Disulfidbrücken reduziert und somit aufgebrochen werden konnten. Der verwendete Lämmli-Puffer setzte sich dabei aus 3,6 mL 10 % SDS, 5 mL Glycerin, 1,5 mL β-Mercaptoethanol und 0,02 % Bromphenolblau zusammen.

Die verwendeten Gele bestanden aus einem Sammel- und einem Trenngel. Das 10 %-ige Trenngel wurde dabei aus den folgenden Komponenten hergestellt:

**Tabelle 2-9: Ansatz für das Trenngel**

Chemikalie	Volumen
dH <sub>2</sub> O	1,6 mL
30 % Acrylamid mix	1,3 mL
1,5 M TrisHCl pH 8,8	1,0 mL
10 % SDS	40 µL
10 % APS	40 µL
TEMED	2 µL

Als letztes wird das Gemisch mit TEMED versetzt, die Suspension daraufhin kurz geschüttelt und danach sofort zwischen zwei, durch einen Spacer getrennte, Glasplatten gegossen und vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Festwerden des Gels wird das Isopropanol mit etwas Whatman-Papier aufgesaugt und das Sammelgel der folgenden Zusammensetzung auf das Trenngel gegossen:

**Tabelle 2-10: Ansatz für das Sammelgel**

<b>Chemikalie</b>	<b>Volumen</b>
dH <sub>2</sub> O	1,00 mL
30 % Acrylamid-Mix	0,26 mL
1,5 M TrisHCl pH 6,8	0,20 mL
10 % SDS	15 µL
10 % APS	15 µL
TEMED	2 µL

Nach Überschichtung des Trenngels mit dem Sammelgel wird ein 10 oder 15 Well-Kamm in das noch flüssige Sammelgel eingetaucht. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert ist, wird der Kamm entfernt und das SDS-Gel ist gebrauchsfertig.

Um die Größe der aufgetrennten Proteine zu ermitteln, wird 3 µL des Markers bzw. Größenstandards „Precision Plus Protein™ Unstained Standards“ der Firma Biorad, Hercules (USA), in eine Tasche des Gels geladen. Von jeder Probe wird 10 µL in die einzelnen Geltaschen geladen. Nach der Gelfärbung wird durch Vergleich mit dem Größenstandard auf die Masse der Proteine geschlossen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt schließlich bei einer Spannung von 300 V und einer Stromstärke von 40 mA in einer mit Laufpuffer gefüllten vertikalen Minigelapparatur. Dabei wird der Laufpuffer so hoch eingefüllt, dass das Gel gerade noch eintauchte. Als Laufpuffer wird SDS-haltige Lösung aus 25 mM Tris, 192 mM Glycerin und 0,1% SDS verwendet. Die Auftrennung wird beendet, nachdem das Bromphenolblau aus dem Gel herausgelaufen ist.

Zur Anfärbung des Gels wird eine Coomassie-Färbung vorgenommen. Dazu wird das Gel in eine mit Coomassiefärbelösung (10%-ige Essigsäure mit einer Spatelspitze Coomassie Brilliant Blue R250) gefüllte Glasschale gelegt, mit einem Deckel verschlossen und in die Mikrowelle gestellt. Nach einem kurzen Aufkochen in der Mikrowelle für ca. 45 s wird das Gel in der Schale für 5 – 10 min auf einer Wippe inkubiert. Daraufhin wird die Färbelösung über einen Filter zurück in die Vorratsflasche gegossen und das Gel mit Wasser gewaschen. Anschließend wird Entfärbelösung (10%-ige Essigsäure) auf das Gel gegossen und nach



erneutem Aufkochen für ca. 45 s in der Mikrowelle, wird das Gel für ca. 30 min auf der Wippe inkubiert. Dabei wird ein gefaltetes Papiertuch mit in die Schale gelegt, um die ausgewaschene Farbe aufzusaugen. Das Papiertuch muss gegebenenfalls öfter gewechselt werden. Die entfärbten Gele können anschließend in Wasser gelagert, Fotografiert oder eingescannt werden.

### **2.2.9. Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese wird dazu genutzt, DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Die DNA kann aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückrades in einer Gelmatrix, an welches ein elektrisches Feld angelegt wird, aufgetrennt werden. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und fluoresziert, können die DNA-Banden unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden. Durch das Auftragen eines Markers von dem die Bandengrößen bekannt sind, kann auf die Größe der Fragmente geschlossen werden.

In dieser Arbeit erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 1 %-igem Agarosegel. Die Agarose wird in 1 x TAE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt ist, werden 25 ng/mL Ethidiumbromid hinzugegeben und in eine vorbereitete Gelkammer gegeben. In der Gelkammer befindet sich ein Probenkamm, durch den die Taschen in dem Gel entstehen in die die DNA-Lösung mit Ladepuffer gegeben wird. Dieses erfolgt nach dem Erstarren des Geles. Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer gegeben und mit TAE-Puffer übergossen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 120 V.

### **2.2.10. Aufreinigung von DNA aus Lösungen und Agarosegelen**

Um DNA oder DNA-Fragmente von Proteinen, Salzen und kleineren DNA-Fragmenten zu befreien oder um sie aus Agarosegelen zu reinigen, werden sie mit Hilfe der Nucleo Spin Kits von Macherey-Nagel gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Eluiert wird anschließend mit einem Volumen von 20 - 30 µL. Die Reinheit und Konzentration der gereinigten DNA wird photometrisch bestimmt.

### 2.2.11. Quantifizierung von DNA in Lösungen

Um die DNA-Konzentration einer Lösung zu quantifizieren und die Reinheit zu bestimmen, wird die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Für doppelsträngige DNA gilt dabei:

$$OD_{260} \times 50 = \mu\text{g DNA/mL}$$

Für eine reine DNA-Lösung gilt:

$$OD_{260}/OD_{280} = 1,8$$

Werte über 1,8 verweisen auf Verunreinigungen durch RNA, Werte darunter auf Verunreinigungen durch Proteine oder organische Chemikalien.

### 2.2.12. Western Blot

Das Verfahren des Western Blot ermöglicht das Übertragen von Proteinen auf eine Membran. Bei dieser Methode werden die Proteine elektrophoretisch auf eine vorher durch Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen. Dazu werden drei 10 x 7 cm Filterpapiere (GB 002, Schleicher & Schüll) mit Laufpuffer getränkt und luftblasenfrei übereinander auf die Elektrodenplatte gelegt. Anschließend werden die aktivierte Membran und das Polyacrylamidgel auf den Stapel gegeben. Zum Abschluss kommen erneut drei in Laufpuffer getränkte Filterpapiere luftblasenfrei hinzu. Der Transfer erfolgte bei 20 V und 5,5 mA/cm<sup>2</sup>. Für ein Gel werden bei 630 mA 30 min benötigt.

### 2.2.13. Immunfärbung

Für den spezifischen Nachweis der produzierten Glucanase wird eine Immunfärbung durchgeführt. Hierzu wird die PVDF-Membran mit den übertragenen Proteinen aus dem Western Blot verwendet. Im ersten Schritt erfolgt ein Abblocken der freien Bindungsstellen durch Inkubation in 2 % (w/v) MPBST. Nach kurzem Waschen erfolgt die Inkubation für 1 h auf einer Wippe mit dem ersten Antikörper (Anti HIS (Penta), Mouse, 1 : 5.000), der gegen des His-Tag des Zielproteins gerichtet ist. Nach der Inkubation wird die Membran 3 x mit 0,05 % (v/v) PBST gewaschen und nach dem dritten Waschen 10 min auf der Wippe im Waschmedium inkubiert. Nach dem erneuten Waschschrift erfolgt die Zugabe des Mouse IgG specific (AP), 1 : 10.000 Antikörper mit Alkalischer Phosphatase gegen Anti-HIS (Penta) – Antikörper. Die Inkubation erfolgt erneut für 1 h. Nach der Inkubation des Zweitantikörpers erfolgt ein erneutes Waschen der Membran. Anschließend wird die Membran in

Substratpuffer äquilibriert, bis zum Eintreten der Färbung entwickelt und durch Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt. Die Membran wird dann zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

#### 2.2.14. Herstellung chemischkompetenter *E. coli* Zellen

100 mL 2 x TY-Medium mit Ampicillin werden mit etwa 2 mL der *E. coli* Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> > 0,1 beimpft und bei 37 °C und 250 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 4 °C und 3.220 x g pelletiert und in 40 mL eiskaltem TFB1 (Tabelle 2-11) resuspendiert. Es erfolgt eine Inkubation für 90 min auf Eis und anschließend ein erneutes Pelletieren für 5 min bei 4 °C und 3.220 g. Das Pellet wird in 4 mL eiskaltem TFB2 (Tabelle 2-12) vorsichtig resuspendiert und in 2 mL Mikro-Schraubröhrchen aliquotiert (200 µL). Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

**Tabelle 2-11: TFB 1**

Chemikalien	Konzentration
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10 mM
CH <sub>3</sub> COOK	30 mM
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	50 mM
RbCl	100 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Der pH-Wert wird mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt.

**Tabelle 2-12: TBF 2**

Chemikalien	Konzentration
Morpholinopropansulfonsäure	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	75 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Der pH-Wert wird nach Bedarf mit Essigsäure oder Kaliumhydroxid auf 8,0 eingestellt.

#### 2.2.15. Transformation von *E.coli* Zellen mittels Hitzeschock

Die Methode der Transformation macht es möglich Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen einzuschleusen. Dazu werden etwa 1 µL Ligationsansatz oder Plasmid-DNA zu 50 µl chemokompetenten Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für genau 60 s bei 42 °C und sofort danach eine Inkubation für 2 min auf Eis. 950 µL auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium (Tabelle 2-13) werden dazugegeben und 1 h bei 37 °C und 600 Upm inkubiert. Die Zellen werden durch einminütiges Zentrifugieren bei 13200 g sedimentiert und auf 2 x TY-Agarplatten mit den

entsprechenden Supplementen ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

**Tabelle 2-13: SOC-Medium**

Chemikalien	Konzentration
Trypton	2 % (w/v)
Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,05 % (w/v)
Magnesiumlösung <sup>1</sup>	20 mM
Glukose	20 mM

<sup>1</sup>Magnesiumlösung besteht aus 1 M MgCl<sub>2</sub> und 1 M MgSO<sub>4</sub>

### 2.2.16. Enzymatische Hydrolyse

Für die Hydrolyse von Scleroglucan (SR) werden verschiedene Enzyme wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, getestet. In der Tabelle 2-14 sind die Ansätze für die durchgeführten Hydrolysen zusammengefasst. Dabei bezieht sich die eingesetzte Enzymmenge auf 1 mL Scleroglucan mit einer Polysaccharidkonzentration von ca. 1 g/L. Der optimale pH-Wert der Enzyme wird nicht beachtet, da, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, die Analysemethode eine salzfreie Scleroglucanprobe voraussetzt.

**Tabelle 2-14: Ansätze für die Hydrolyse**

Name	T [°C]	[µL Enzym/1ml SR]	Probennahme [min]
AS 100	50	20	0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 *
<i>B. subtilis</i>	55	2 U	0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 90; 120
BG	50	1	0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 *
GH16	65	5 U	
GH81	65	5 U	
Laminarinase	37	0,324 U	0; 10; 20; 30; 40; 50; 60
NS	50	1	0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 *
<i>P. funiculosum</i>	55	10	0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 90; 120
<i>T. harzianum</i>	50	5	0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 90; 120
<i>T. reesei</i>	50	5	0; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 90; 120
TBG	50	1	0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 *

\*Probennahmeneinheit [h]

Die Scleroglucanproben werden in einem Schüttelwasserbad entsprechend temperiert, bevor die Enzymzugabe erfolgt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt bei 95 °C für 20 min. Wenn nötig erfolgt nach dem Abstoppen ein Zentrifugieren der Probe bei 13.000 Upm für 5 min. und die Überführung in ein neues Reaktionsgefäß. Für eine Charakterisierung der Glucanaseaktivität werden die reduzierenden Enden (Kap. 2.2.2), die freie Glucose (Kap. 2.2.3 Kap. 2.2.4) und die Molekulargewichte (Kap. 2.2.4) bestimmt.

### Charakterisierung der Glucanaseaktivität

Die Charakterisierung der Glucanaseaktivität erfolgt nach folgendem Schema:

**Tabelle 2-15: Schema zur Charakterisierung der Glucanaseaktivität**

Aktivität	red. Enden	freie Glucose (GPC)	Differenz (red. Enden – freie Glucose)
Exo	steigt	Wert steigt	Konstant
Endo	steigt	Wert konstant	Steigt
Gemisch	steigt	Wert steigt	Steigt

Dieses bedeutet zum Beispiel für eine Exoglucanase-Aktivität:

Bestimmung der reduzierenden Enden → steigt

Bestimmung der freien Glucose → Wert steigt

Die Differenz aus dem Wert der reduzierende Enden und dem der freien Glucose wird mittels GPC bestimmt. Bleibt die Differenz der reduzierenden Enden und der freien Glucose relativ konstant über den Hydrolyseverlauf, dann entspricht das einer Exoglucanase-Aktivität.

### Erstellung eines Größenstandards mit Optimash™ TBG

Zunächst werden für die Erstellung des Größenstandards 300 mL Scleroglucan mit 300 µL des Enzyms Optimash™ TBG versetzt. Dieses Gemisch wird für 5 h bei 50 °C gerührt. Danach wird die Reaktion für 25 min bei 95 °C abgestoppt.

Um das hochmolekulare Scleroglucan von Molekülen niedrigeren Molekulargewichts zu separieren, wird das mit Optimash™ TBG behandelte Scleroglucan dreimal einer Querstromfiltration mit einem Filter aus Polypropylen der Porengröße 0,2 µm unterzogen (Kap. 2.2.19). Während der Querstromfiltration wird das Volumen zunächst jeweils von 300 mL Ausgangsvolumen auf ca. 40 mL reduziert, bevor das Volumen des Retentats mit Natriumazid-Lösung der Konzentration 0,2 g/L wieder auf 300 mL erhöht wird. Nach jeder Volumenerhöhung werden vom Retentat 2 mL Probe entnommen und für die Analyse mittels GPC vorbereitet, sodass nach dreimaliger Querstromfiltration insgesamt drei Proben zur Analyse zur Verfügung stehen.

### **2.2.16.1. Enzymatische Hydrolyse im 20 L-Maßstab**

Mit dem Enzym AS 100 wird eine Hydrolyse im 20 L-Maßstab durchgeführt. Dazu wird ein 50 L-Bioreaktor, ausgerüstet mit pH-Elektrode und pT100-Thermometer verwendet. Dieser wird mit 20 L Scleroglucanlösung (ca. 2 g/L) befüllt, welche mit NaOH-Plättchen auf pH 6 gebracht und auf 50 °C temperiert wird. Zur Durchmischung werden zwei Schrägblattrührer (Durchmesser Verhältnis 0,64, Höhe: 40 mm) verwendet. Der Start der Hydrolyse erfolgt durch die Zugabe von 400 mL Enzymlösung. Proben werden zur 0. und 30. Minute, danach im 20 Minutentakt bis zur 130. Minute und anschließend alle 10 Minuten genommen. In den Proben wird mittels Enzymtest die Glucosekonzentration gemessen und danach die Reaktion gestoppt. Nach 200 Minuten wird die Reaktorhydrolyse abgebrochen. Dazu wird der Reaktor im Sterilisationsmodus auf 80 °C gebracht und diese Temperatur durch manuelle Regelung für 1 h gehalten. Anschließend werden zur Stabilisation der Lösung 5 g/L Ameisensäure hinzugegeben. Um das nicht hydrolysierte Scleroglucan aus dem Hydrolyseansatz abzutrennen, wird eine Querstromfiltration durchgeführt. Dabei wird ein ProstaK™ UF Plac 0,1 µm Modul eingesetzt. Das aufkonzentrierte Retentat wird mit 10 L Wasser (enthält 5 g/L Ameisensäure) an der Querstromfiltrationsanlage gewaschen. Das Filtrat wird bei 4 °C gelagert und das Retentat (Restglucan) aufgrund starker Verschmutzung verworfen. Die Verschmutzung geht auf die Anreicherung von Proteinen und Salzen im Prozess zurück.

### **2.2.17. pH-Wert Verschiebung**

Bereits einer Dialyse unterzogenes Scleroglucan (Kap. 2.2.1) wird durch Zugabe von NaOH-Plättchen auf einen pH-Wert von mindestens 12,5 gebracht. Anschließend wird der pH-Wert durch Zugabe von 98 %-iger Ameisensäure auf pH 6 eingestellt. Ein so behandeltes Scleroglucan wird zweimal der unter (Kap. 2.2.1) beschriebenen Dialyse unterzogen, bevor es für die Hydrolyse eingesetzt werden kann.

Bei Untersuchung des Einflusses der Zeit auf die Molekulargewichtsgröße wird die Lösung entsprechend lange auf dem pH 12,5 gehalten.

### **2.2.18. Thermische Oberflächenhydrolyse**

Die thermische Oberflächenhydrolyse wird in einem Autoklaven bei 121 °C und 1 bar Druck durchgeführt. Dabei wird unterschiedlich behandeltes Scleroglucan auf verschiedenen Oberflächen getestet. Es werden folgende Materialien überprüft: Edelstahlzentrifugenbecher, PE-Zentrifugenbecher und Schott-Duran-Laborflaschen (Schott AG, Mainz, Germany). Die

Schott-Duran-Laborflaschen werden durch eine Vorbehandlung aktiviert, indem sie mit 1 M Salzsäure autoklaviert werden. Danach werden sie mit dH<sub>2</sub>O ausgespült und mit dem vorbehandelten Scleroglucan befüllt.

Für den Versuch wird eine 1 g/L Scleroglucanlösung angesetzt. Diese Lösung wird gedrittelt. Ein Drittel wird nicht weiter behandelt und bis zum Start des Versuches bei 4 °C gelagert. Die anderen beiden Ansätze werden gegen dH<sub>2</sub>O bzw. eine 0,1 g/L Natriumazidlösung für mindestens 12 h dialysiert. Von jedem Ansatz wird eine 15 mL Probe entnommen und für die Analytik bei 4 °C gelagert. Von jedem der drei Ansätze werden 30 mL in die vorbehandelten Schottflaschen gegeben und jeweils 20 mL in die Edelstahlzentrifugenbecher und PE-Zentrifugenbecher abgefüllt. Die Ansätze werden dann für 72 h autoklaviert. Anschließend werden die Proben zentrifugiert und das Sediment verworfen. Aus den Proben werden die reduzierenden Enden (Kap.2.2.2), die Scherviskosität (Kap.2.2.5) und die Molekulargewichte (Kap.2.2.4) wie der pH-Wert bestimmt.

### 2.2.19. Aufreinigung der Hydrolyseprodukte

Die Aufreinigung der Hydrolyseprodukte erfolgt über Querstromfiltration und Dialyse. Dabei kommen bei der Querstromfiltration zwei verschiedene Module abhängig von dem Probenvolumen zum Einsatz.

#### Querstromfiltration mit Vivaflow 200

Um das hochmolekulare Scleroglucan von Molekülen niedrigeren Molekulargewichts zu separieren, wird hydrolysiertes Scleroglucan dreimal einer Querstromfiltration mit einem Filter aus Polypropylen der Porengröße 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech S.A) unterzogen. Das Retentat wird nach jedem Durchgang mit 0,2 g/L NaN<sub>3</sub> und dem entsprechend eingesetzten Volumen wieder auf die Ausgangskonzentration gebracht. Eine weitere Aufarbeitung der Hydrolysate erfolgt über folgende Filter:

Porenweite	0,2 µm
Porenweite	100.000 g/mol
Porenweite	50.000 g/mol
Porenweite	5.000 g/mol

### Querstromfiltration ab 20 L

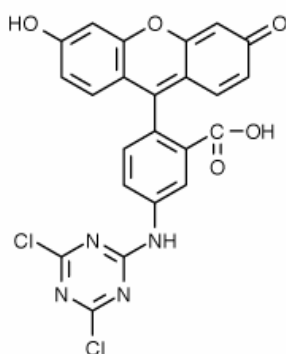
Die Aufarbeitung der unter Kapitel 2.2.16.1 beschriebenen Hydrolyse erfolgt mit einem Millipore Process System. Dabei kam ein Prosta<sup>TM</sup> UF Plac 0,1 µm Modul zum Einsatz.

### Einengung des Filtrats

Die Aufkonzentrierung des Filtrats erfolgte schrittweise über Gefriertrocknung.

## **2.2.20. Fluoreszenzmarkierung von Scleroglucan**

Um das Scleroglucan in geringen Konzentrationen sowohl optisch als auch quantitativ, z.B. an der inneren Darmwand, nachweisen zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff 5-(4,6-Dichlorortotriazinyl)aminofluorescein (5-DTAF) getestet (Abbildung 2-2).



**Abbildung 2-2: 5-(4,6-Dichlorortotriazinyl)aminofluorescein (5-DTAF) als Marker für Scleroglucan**

2 g/L 5-DTAF werden zu einer wässrigen Lösung mit 1g/L Scleroglucan gegeben und über Nacht unter stetigem Schütteln gelöst. Um überschüssiges 5-DTAF zu entfernen wird das Glucan mit 2-Propanol gefällt und anschließend das Präzipitat 3x mit 2-Propanol gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird das fluoreszenzgefärbte Glucan in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,6 aufgenommen.

## **2.2.21. Ultraschallabbau von Scleroglucan**

Der Ultraschallabbau wird mit Scleroglucan der Konzentration 1,0 g/L vorgenommen. Das eingesetzte Volumen liegt bei 100 mL. Um eine Überhitzung der Lösung zu vermeiden wird der Abbau mit einer Zeitschaltuhr vorgenommen. Die Einstellung wird dabei so vorgenommen, dass die Sonotrode nur für 33 % der Zeit betrieben wird. Bei einer Gesamtzeit von 90 min wird die Sonotrode somit nur für 30 min betrieben. Alle im Ergebnisteil



aufgeführten Abbauzeiten entsprechen der tatsächlichen Abbauzeit und werden somit schon auf 1/3 der gemessenen Gesamtbetriebszeit der Sonotrode reduziert. Die tatsächliche Abbauzeit beträgt 10, 20 und 30 min.

Zudem wird der jeweilige Abbau in einem 150 mL-Becherglas vorgenommen. Dabei wird die Lösung leicht gerührt und mit Hilfe eines Eisbades gekühlt. Die Eintauchtiefe der Sonotrode in die Lösung beträgt 13 mm.

Zum Einsatz kam das Gerät Labsonic L mit der Sonotrode 1000 L (B. Braun).

Es wurden jeweils 12 mL Probe entnommen und am Rotationsviskosimeter sowie mittels Gelpermeationschromatographie mit Kapillarviskositätsdetektor analysiert.

### 2.2.22. Kultivierung von *Trichoderma harzianum*

Der Stamm *Trichoderma harzianum* (CECT-Nummer 2413) wurde aus der spanischen Stammsammlung CECT („The Spanish Type Culture Collection“) in gefriergetrockneter Form bezogen.

#### Aufbereitung der gefriergetrockneten Pellets

Das Pellet war in einer Doppel-Ampulle unter Vakuum eingeschlossen und wurde der beiliegenden Anleitung entsprechend geöffnet. Nach Resuspension in 1 mL MPG-Medium wurden die Zellen nach 30 minütigem Quellen in 7 mL MPG-Medium überführt. Die mit dieser Suspension angeimpften Medien sind den TabellenTabelle 2-16 und Tabelle 2-17 zu entnehmen.

**Tabelle 2-16: MPG-Medium**

Substanz	Konzentration [g/L]
Malzextrakt	20
Soja Pepton	1
Glucose	20
Agar	15

#### Kultivierungsbedingungen

Falls nicht anders angegeben, werden die Kulturen bei 30 °C auf einem Schüttler mit 110 Upm im Dunkeln inkubiert.

### Mediumwechsel

Die Zellen werden unter sterilen Bedingungen mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %iger NaCl) in einem sterilen Faltenfilter 595 ½ (Durchmesser; 240 mm; Schleicher & Schuell) gewaschen und mit Hilfe eines ebenfalls sterilen Spatels in das Induktionsmedium überführt.

### Nährmedien für die Kultivierung in Flüssigkultur

Für die Kultivierung von CECT 2413 in Flüssigkultur wird eine Zwei-Schritt-Kultivierung durchgeführt. Im ersten Schritt wird flüssiges MPG-Medium verwendet. In diesem Medium stehen ausreichend Glucose und andere Nährstoffe zur Verfügung. Die Zellen sollten in diesem Medium eine gute Basis zum Heranwachsen auf eine für die Versuche ausreichende Biomasse erhalten.

Ausgehend von diesen vitalen Zellen werden 500 mL Medium im Schüttelkolben (mit zwei Schikanen) beimpft. Diese enthalten eine modifizierte Form des Czapek-Mediums mit einer definierten Anzahl von Kohlenstoffquellen, die gleichzeitig als Induktor der Glucanase dienen sollen. Die entsprechenden Ansätze für die Bestimmung des optimalen Induktors sind der Tabelle 2-18 zu entnehmen, die Optimierung der Induktionsbedingungen der Tabelle 2-19.

Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 5 ist wichtig für die Glucanaseproduktion. Es erfolgt keine Produktion oberhalb eines pH Wertes von 7.

**Tabelle 2-17: Czapek-Medium**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration [g/L]</b>
NaNO <sub>3</sub>	3,0
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0

Die pH-Werte wurden je nach Bedarf mit 0,2 oder 1 M NaOH bzw. HCl eingestellt.

Tabelle 2-18: Kultivierungsbedingungen zur Ermittlung des optimalen Induktors

Ansatz	Induktor	Glucosekonzentration [%]
1	---	0,1
2	---	0,5
3	---	10
4	Chitin	0,1
5	Chitin	0,5
6	Chitin	10
7	<i>S. cerevisiae</i>	0,1
8	<i>S. cerevisiae</i>	0,5
9	<i>S. cerevisiae</i>	10
10	Chitin	---
11	<i>S. cerevisiae</i>	---

Tabelle 2-19: Optimierung des Induktors zur Endoglucanasegewinnung

Ansatz	Glucose [%]	<i>S. cerevisiae</i> [%]	Scleroglucan nativ [%]
A	0,1	1	---
B	0,1	0,8	0,2
C	0,1	0,6	0,4
D	0,1	0,4	0,6
E	0,1	0,2	0,8
F	0,1	---	1
G	0,1	1	0,4
H	0,1	1	0,6
I	0,1	1	0,8
J	0,1	1	1

### 2.2.23. Klonierung einer Glucanase in *E. coli*

#### 2.2.23.1. RNA-Isolation

Um die Gesamt-RNA aus den Zellen zu isolieren wird ein Protokoll auf Basis des Trizol-Reagenzes verwendet. Weitere notwendige Substanzen sind Chloroform, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1 = PCI), 0,1 %iges DEPC-Wasser (RNase-frei), Isopropanol und 70%iges Ethanol (verdünnt mit RNase-freiem DEPC-Wasser). Bei DEPC handelt es sich um Diethylpyrocarbonat. Dieses modifiziert Histidinreste in Proteinen zu N-Carbethoxyhistidin und führt allgemein zur Hemmung von Enzymen. Auch die sehr widerstandsfähigen RNasen, die z.B. durch das Autoklavieren nicht beseitigt werden können, überstehen die Behandlung mit DEPC nicht.

Es wurde 1 mL DEPC zu 1000 mL dH<sub>2</sub>O gegeben und über Nacht gerührt. Ein anschließendes Autoklavieren beseitigte DEPC, in dem es mit Wasser zu Ethanol und CO<sub>2</sub> hydrolysiert wurde.

Die Zellen werden mit einem sterilen Faltenfilter (595 ½ Durchmesser = 240 mm; Schleicher & Schuell) vom Kulturmedium getrennt und mit einem sterilen, RNase-freien Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Mörser und Pistill werden zuvor unter sterilen Bedingungen mit autoklavierter 1 M NaOH behandelt, mit 0,1 %igen DEPC-Wasser gewaschen und zweifach autoklaviert. 200 mg gemörsertes Material wird in RNase-freie 2 mL Reaktionsgefäße gefüllt und mit 1 mL Trizol durch Schütteln für einige Sekunden homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei RT werden 200 µL Chloroform hinzugegeben und durch Invertieren der Reaktionsgefäße 15 sec gemischt. Nach einer weiteren Inkubation für 2 - 3 min bei RT folgt die Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico) bei 2000 Upm für 20 min. 550 µL der wässrigen Phase werden abgenommen und in 2 mL Reaktionsgefäße mit 550 µL PCI transferiert. Die Proben werden vorsichtig gevortext und für 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein Reaktionsgefäß mit 550 µL Chloroform überführt und nach vorsichtigem Invertieren der Gefäße für weitere 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in 500 µL Isopropanol transferiert und durch Invertieren der Gefäße vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 – 3 min auf Eis wird 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1 mL 70 % EtOH durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm gewaschen.

Nach Entfernung aller EtOH-Reste durch Trocknung unter der Cleanbench wird das Pellet in 50 µL 0,1 %igem DEPC-Wasser resuspendiert und die Konzentration der RNA (Nanodrop 1000; Thermo Scientific) bestimmt.

#### **2.2.23.2. mRNA-Isolation**

Nach der Gesamt-RNA-Isolation wird aus einem Teil der RNA-haltigen Lösung in einem zusätzlichen Schritt die mRNA isoliert. Dies erfolgte mit dem „Oligotex mRNA Mini Kit“ der Firma „Qiagen“. Die Prozedur beruht auf der Affinität des Poly A<sup>+</sup> Bereiches der mRNA gegenüber dem Poly-(dT)-Säulenmaterial. Dabei handelt es sich um dC10T30-Oligonukleotide, die an einheitlichen kugelförmigen Polystyrol-Latex-Partikeln mit einem Durchmesser von 1,1 µm kovalent über eine Kondensationsreaktion gebunden sind. Diese kovalente Bindung ist auch bei höheren Temperaturen und gegenüber Lauge und Formamid stabil.

Die Oligotex-Suspension (aus dem Kit) wird in einem Heizblock auf 37 °C temperiert, gevortext und anschließend bei RT aufbewahrt. Der im Kit befindliche Puffer OEB wird auf 70 °C im Heizblock erhitzt und dort bis zur Benutzung aufbewahrt. 40 µL der Gesamt-RNA-Lösung werden mit 210 µL RNase-freiem Wasser in ein 1,5 mL RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 250 µL OBB-Puffer und 15 µL der Oligotex Suspension wird der Ansatz durch Vortexen vermischt.

Um Sekundärstrukturen aufzulösen wird die Probe für 3 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wird bei RT die Hybridisierung zwischen mRNA und dem Oligo-(dT30) -Bereich der Oligotex Suspension ermöglicht. Durch eine nun folgende Zentrifugation bei 13.000 Upm erfolgt das Pelletieren des Oligotex-mRNA-Komplexes. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 400 µL OW2-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Durch Überführen des resuspendierten Pellets in eine kleine mitgelieferte „Reagiergefäß-Filtereinheit“ und einer anschließenden einminütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm wird das Pellet gewaschen. Dieser Schritt wird direkt im Anschluss wiederholt. Die Reagiergefäß-Filtereinheit wird nach jeder Zentrifugation in ein neues RNase-freies 1,5 mL Reagiergefäß überführt.

Im letzten Schritt wird durch Zugabe von 30 µL OEB-Puffer die mRNA von der Oligotex-Suspension getrennt und durch eine einminütige Zentrifugation in ein RNase-freies 1,5 mL Reagiergefäß überführt. Der letzte Schritt wird insgesamt zweimal mit der gleichen Oligotex-Suspension durchgeführt, so dass ein Endvolumen von 60 µL vorlag. Diese 60 µL mRNA-haltige Lösung werden bei - 80 °C aufbewahrt.

### **2.2.23.3. cDNA-Synthese**

Die Synthese der cDNA ausgehend von der Gesamt-RNA oder mRNA wird mit Hilfe des „SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ der Firma „Invitrogen“ durchgeführt.

Das Kit wird mit Random-Hexamer- (50 ng/µL) und Oligo-(dT)20-Primern (50 µM) ausgeliefert. Welcher Primer im jeweiligen Fall verwendet wird, ist an entsprechender Stelle im Ergebnisteil erwähnt.

Es werden 8 µL RNA-Lösung mit 1 µL des jeweiligen Primers und 1 µL des dNTP-Mixes (10 mM) in ein 500 µL PCR-Klonierungsgefäß gegeben. Bei Einsatz von weniger als 8 µL RNA-Lösung wird mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 10 µL aufgefüllt.

Dieser Mix wurde im Thermocycler 5 Minuten bei 65°C inkubiert, für 1 – 2 Minuten auf Eis gestellt und danach mit 10 µL des cDNA-Synthese-Mix versetzt. Dieser setzt sich wie folgt zusammen:

10x RT Puffer	2 µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µL
0,1 M DTT	2 µL
RNase OUT <sup>TM</sup>	1 µL
SuperScript <sup>TM</sup> III RT 200 U	1 µL

Das weitere Vorgehen wird von dem verwendeten Primer bestimmt. Bei Einsatz der Random-Hexamere folgte eine 10 minütige Inkubation bei 25 °C und anschließend der eigentliche cDNA-Syntheseschritt für 50 min bei 50 °C, gefolgt vom Abbruch der Reaktion bei 85 °C für 5 min. Bei Einsatz der Oligo-(dT)<sub>20</sub>-Primer wird der Schritt bei 25 °C übergangen und nach Zugabe sofort mit dem cDNA-Syntheseschritt fortgefahren.

In beiden Fällen wird abschließend ein 20 minütiger RNA-Verdau bei 37 °C unter Zugabe von 1 µL RNase OUT<sup>TM</sup> (= 40 U) durchgeführt. Die so gewonnene sscDNA wird in 500 µL PCR-Gefäßen bei - 20 °C aufbewahrt.

#### 2.2.23.4. Amplifikation der Endoglucanase BNG13.1

Ausgehend von der Gesamt-RNA und von der mRNA wird je eine cDNA mit Oligo-(dT)<sub>20</sub>- und Random-Hexamer-Primern synthetisiert (Kap. 2.2.23.3).

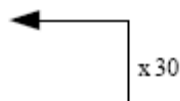
Mit diesen cDNAs werden folgende PCRs durchgeführt:

**Tabelle 2-20: Reaktionsansatz zur Amplifizierung der Endoglucanase aus cDNA-Reaktionsansatz**

5x Phusion-HF-PCR-Puffer	10 µL
10 mM dNTP-Mix	1 µL
Primer f3	0,2 µL
Primer r3	0,2 µL
Template	2 µL
Phusion-Polymerase	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

Der Ansatz wird auf Eis stehend gekühlt vorbereitet und ohne Hot-Start nach folgendem Programm durchgeführt:

- 1) Initiale Denaturierung: 98 °C, 30 s
- 2) Denaturierung: 98 °C, 10 s
- 3) Annealing: 57 °C, 30 s
- 4) Extension: 72 °C, 1 min
- 5) Final-Extension: 72 °C, 10 min



Mit dem verwendeten Primerpaar 3 sollte ein Fragment mit einer Größe von 2.187 bp amplifiziert werden können.

Ausgehend von den so erhaltenen PCR Produkten wird nach Aufreinigung der PCR-Produkte eine erneute PCR durchgeführt, um die Restriktionsschnittstellen für das jeweilige Plasmid zu erhalten.

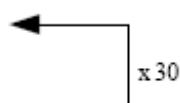
PCR für Plasmid:

**Tabelle 2-21: Reaktionsansatz zur Restriktionsschnittstellengewinnung für PET21A+ und PET21A+ mit pELB-Sequenz**

5x Phusion-HF-PCR-Puffer	10 µL
10 mM dNTP-Mix	1 µL
Primer a	1 µL
Primer b oder c	1 µL
Template (Konzentration von 1 ng/µL)	1 µL
Phusion-Polymerase	0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

Der Ansatz wird nach folgendem Programm durchgeführt:

- 1) Initiale Denaturierung: 94 °C, 2 min
- 2) Denaturierung: 94 °C, 30 s
- 3) Annealing: 60 °C, 30 s
- 4) Extension: 72 °C, 1 min
- 5) Final-Extension: 72 °C, 10 min



#### 2.2.23.5. Restriktionsverdau und Ligation der PCR-Produkte

Für die Erzeugung von Restriktionsschnittstellen werden die Puffer (Nbe-Puffer 2) und Enzyme (NotI und NheI), für den Vektor pET21A+, nach Herstellerangaben verwendet. Für die Erzeugung von Restriktionsschnittstellen für den Vektor PET21A+ mit PELB-Sequenz wird der NBE-Puffer 4 und die Enzyme NotI und NcoI nach Herstellerangaben verwendet.

Der Restriktionsverdau wurde bei 37 °C mit den entsprechenden Enzymen über 3 – 7 h durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Dephosphorylierung und die Aufreinigung des Restriktionsansatzes.

**Tabelle 2-22: Ansätze für den Restriktionsverdau**

Puffer (10 x konzentriert)	5 µL	
Restriktionsendonucleasen	2 µL/Restriktionsendonuclease	20 - 30 U
BSA	0,5 µL	2 µg
DNA	3 – 10 µL	ca. 1 µg
H <sub>2</sub> O	ad 30 µL	

#### Dephosphorylierung endständiger 5'-DNA-Phosphatgruppen

Um Phosphatgruppen am 5'-Ende von Nukleinsäuren für eine darauffolgende Ligation zu entfernen werden diese enzymatisch mittels Calf Intestine Phosphatase (CIP) abgespalten. Die Dephosphorylierung erfolgte direkt nach der Restriktion von DNA-Fragmenten und der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen. 0,5 µL CIP wird in den Restriktionsansatz gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert, darauf wurde erneut 0,5 µL CIP zu dem Ansatz gegeben und wieder 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Enzym für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Nach der Dephosphorylierung wird die DNA aufgereinigt und konnte für die Ligation verwendet werden.

#### Ligation

Um die geschnittenen Enden zweier DNA-Fragmente zu ligieren wird eine Ligation mit der T4-DNA Ligase und den entsprechenden Puffern durchgeführt. Der gesamte Ansatz wird über Nacht bei 16 °C inkubiert.

**Tabelle 2-23: Volumen- und Mengenangabe für die Ligation**

T4 DNA-Ligase 10x Puffer	2 µL
T4 DNA-Ligase, 0,6 U	0,3 µL
Vektor DNA	50 ng
Insert DNA	Molares Verhältnis 1:3
H <sub>2</sub> O	ad 20 µL

Der Ligationsansatz wird direkt für eine Hitzeschock-Transformation in *E. coli* XL-1 Blue Zellen verwendet.



### 2.2.24. Glucanase Produktion in *E. coli*

Positive Klone aus dem Ligationsansatz aus Kapitel 2.2.23.5 werden nach Sequenzierung durch Hitzeschock-Transformation in BLR (DE3) Zellen zur Produktion der Glucanase überführt.

Alle Variationen zur Glucanaseproduktion werden aus einer Vorkultur gestartet, die über Nacht bei 37 °C und 250 Upm in YT-Medium gewachsen ist. Das Produktionsmedium (2 x YT-Medium mit Ampicilin und 1 % Glucose) wird mit der Vorkultur so eingestellt, dass beim Start eine optische Dichte von 0,1 bei 600 nm vorliegt. In Tabelle 2-24 und Tabelle 2-25 sind die getesteten Ansätze zur Produktion eines löslichen Produktes gezeigt. Die Expression wird durch die angegebene Zugabe von IPTG gestartet. Ein Abbruch der Reaktion erfolgt durch das Abzentrifugieren der Zellen. Für die weitere Untersuchung wird der Überstand und das Zellpellet bei - 20 °C gelagert. Eine Probennahme von 1 mL erfolgt vor der Induzierung durch IPTG und nach Abbruch der Reaktion.

**Tabelle 2-24: Expressionsansätze zur Produktion der Glucanase in pET 21 A+**

<b>IPTG</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Produktionszeit [h]</b>
10 µM	25; 30	4
	17	24
50 µM	25; 30	4
	35	3
	17	24
1 mM	25; 30	4
	35	3

**Tabelle 2-25: Expressionsansätze zur Produktion der Glucanase in pET 21A+ pelB**

<b>IPTG</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Produktionszeit [h]</b>
1 mM	17	24
	25	4

#### Aufarbeitung des Expressionsproduktes

Der Überstand (Ü) und das Zellpellet (P) werden aufgetaut. Das Zellpellet aus 1 mL Überstand wird in 200 µL BugBuster Master Mix (Novagen) gelöst und 15 min bei RT auf einem Überkopfschüttler bei 25 Upm inkubiert. Anschließend erfolgt ein abzentrifugieren bei 4 °C über 20 min. Danach wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet in 200 µL dH<sub>2</sub>O gelöst. Der Überstand wird im Folgenden als Überstand-Zellpellet (ÜP) bezeichnet. Die so erhaltenen Proben werden, wie in Kapittel 2.2.8 beschrieben, mittels SDS-Page auf die Produktion der Glucanase untersucht.

### 2.2.25. Fütterungsversuch

Der im Folgenden beschriebene Fütterungsversuch wurde durchgeführt von Meike Küting und Sonja Eichholz in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierernährung (ehemals FAL jetzt Friedrich-Loeffler-Institut, Braunschweig). In einem Schweineaufzuchtstall wurden 5 Wochen lang 80 Ferkel gehalten. Diese waren bei Beginn des Versuchs 3 Wochen alt. Die 20 Boxen waren jeweils mit 4 Tieren (männlich oder weiblich) besetzt. 10 Gruppen (Tabelle 1) mit jeweils 4 kastrierten männlichen oder 4 weiblichen Ferkel wurden eingerichtet, so dass sich ein mittleres Gewicht von ca. 7 kg pro Ferkel ergab. Den Schweinen wurden während der Studie Trockenfutter (plus  $\beta$ -Glucan) und Wasser nach Bedarf bereitgestellt. Die Zugabe erfolgte in 100 ml Portionen mit jeweils 500 mg  $\beta$ -Glucan. Die 10 Gruppen (2 Boxen pro Gruppe) wurden unterteilt in: Kontrolle (Gruppe 1) ohne Zusätze, plus Ameisensäure (Gruppe 2), plus Hefehydrolysat MACROGARD™ (Gruppe 3), plus  $\beta$ -Glucan in unterschiedlichen Konzentrationen (Gruppe 4 - 8), plus Actigum CS11 (kommerzielles Scleroglucan MW 500.000 g/mol; Fa. Cargill) (Gruppe 9) und gefriergetrocknetes  $\beta$ -Glucan (Gruppe 10).

**Tabelle 2-26: Gliederung des Fütterungsversuches. Einteilung von 80 Ferkeln in 10 Gruppen mit je 4 männlichen (kastriert) und 4 weiblichen Tieren.**

Gruppe	Boxnummer	Zusätze
1	1; 11	keine
2	2; 12	Ameisensäure, 500 mg/kg Futter
3	3; 13	MACROGARD, 200 mg/kg Futter
4	4; 14	$\beta$ -Glucan, 25 mg/kg Futter
5	5; 15	$\beta$ -Glucan, 50 mg/kg Futter
6	6; 16	$\beta$ -Glucan, 100 mg/kg Futter
7	7; 17	$\beta$ -Glucan, 200 mg/kg Futter
8	8; 18	$\beta$ -Glucan, 500 mg/kg Futter
9	9; 19	Actigum, 200 mg/kg Futter*
10	10; 20	$\beta$ -Glucan, gefriergetrocknet, 100 mg/kg Futter*

\* Das getrocknete  $\beta$ -Glucan wurde ebenfalls vor Futterzugabe in wässriger Ameisensäure gelöst.

Das Gewicht und die Futteraufnahme wurden 1x pro Woche bestimmt und auf den entsprechenden Wert pro Tag berechnet. Die Ferkel Nr. 1 (Box 7, Gruppe 7) und Nr. 23 (Box 5, Gruppe 5) starben. Besondere Symptome waren nicht erkennbar. Die anderen Ferkel blieben gesund, medizinische Versorgung war nicht notwendig. Die genommenen Blutproben wurden sofort aufgearbeitet und das Serum und Plasma wurde von einander getrennt und bei -20 °C gelagert. Die erhaltenen Proben werden auf den Gehalt von TNF- $\alpha$  und Interleukin 6 und -10 getestet.

### 2.2.26. Transport durch die Darmwand

Die Ussing-Kammer ist benannt nach ihrem Entwickler Hans Ussing, der sie erstmals im Jahre 1951 beschrieb. Mit dem Prinzip der Ussing-Kammer ist es möglich Transportfunktionen am lebenden Epithel zu untersuchen.

#### 2.2.26.1. Aufbau der Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer ist in zwei Hälften geteilt. Ein Austausch kann nur über das Epithel erfolgen. Jede Hälfte ist mit einem Reservoir mit eigenem Zu- und Ablauf verbunden. Die Flüssigkeit wird durch das Einströmen von Gas zum Zirkulieren gebracht. So findet ein Austausch von Flüssigkeit in der Kammer statt. Durch die Doppelwandung des Reservoirs kann eine Temperierung des Puffers erfolgen. Über ein Paar gewebe-nahe und gewe-beferne Elektroden kann eine Messung der Potenzialdifferenz erfolgen und somit der aktive Transport erfasst werden.

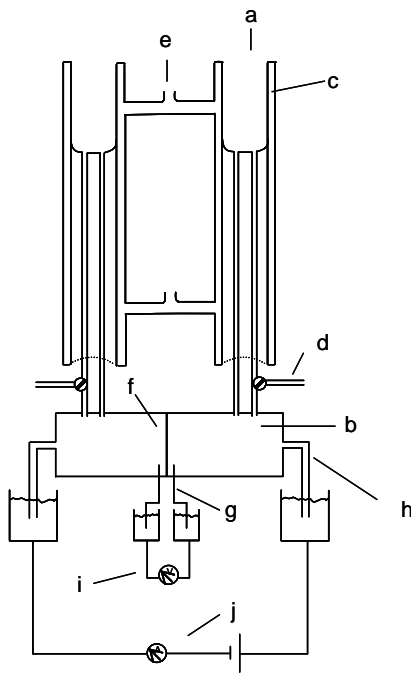


Abbildung 2-3: Schematische Zeichnung der Ussing-Kammer. a) Reservoir mit Zu- und Ablauf für die rechte Kammerhälfte; b) rechte Hälfte der Ussing-Kammer; c) Doppelwandung des Reservoirs; d) Zulauf für Gas zur Pufferzirkulation; e) Zulauf für Wasser um den Puffer im Reservoir zu temperieren; f) Epithel, welches die Kammerhälften trennt; g) gewebe-nahe Elektroden; h) gewe-beferne Elektroden; i) Voltmeter; j) Amperemeter mit variabler Gleichstromquelle

#### 2.2.26.2. Gewebepreparation und Ablauf des Versuches

Als Versuchstier für den Darmtransportversuch wurde ein Ferkel verwendet. Das Tier wird mit der Bolzenschussmethode getötet, wird anschließend zum Ausbluten die Kehle

durchgeschnitten. Danach wurde sehr zeitnah der Bauchraum geöffnet, die Darmbereiche für die Versuche entnommen und sofort mit Ringerlösung gereinigt und auf Eis für die weitere Probenvorbereitung gelagert. Nach dem Spülen wird der Darm an der Ader aufgeschnitten und die Mucosa entfernt („gestrippt“). Der so von Faeces und Mucosa befreite Darm wird in die vorbereitete Ussing-Kammer eingespannt. Zuvor erfolgte eine Zugabe von 10 mL Elektrolytlösung in die Reservoirs (a). Nach der Kalibrierung (Kurzschluss) wurde 200 µL der Scleroglucanlösung (2.5) zu den 10 mL auf der mucosalen Seite gegeben. Die Versuchsdauer betrug 2 h. Als Nullprobe wurde in 10 mL der Elektrolytlösung der mucosalen Seite 200 µL der Scleroglucanlösung gegeben und über denselben Zeitraum bei RT stehen gelassen. In der anschließenden Auswertung wurde die Fluoreszenz der Nullprobe auf 100 % gesetzt, um so den Einfluss auf die Fluoreszenz durch die Versuchsbedingungen auszuschließen.

### 2.2.26.3. Elektrolytlösungen

Tabelle 2-27: Zusammensetzung des Colon-Puffers

Substanz	Konzentration [mmol/L]
NaCl	53,6
KCl	5,4
1 N HCl	0,2
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,2
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,2
Na-Acetat * 3 H <sub>2</sub> O	36
Na-Propionat	15
Na-Butyrat	9
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	1,5
Na-Gluconat	6
HEPES	10
NaHCO <sub>3</sub>	21
Mannit	2

Tabelle 2-28: Zusammensetzung des Jejunum- und Ileum-Puffers

Substanz	Konzentration [mmol/L]
NaCl	113,6
KCl	5,4
1 N HCl	0,2
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	1,2
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,2
NaHCO <sub>3</sub>	21
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	1,5
Glucose	10
Mannit	2
HEPES	7
Na-Gluconat	6

### 2.2.27. Abbau durch Mikroorganismen im Darmtrakt

Es wurde der Darminhalt (DI) von drei Tieren verwendet: Pferd, Schwein und Rind. Die Tiere wurden an der Tiermedizinischen Hochschule Hannover getötet und der DI anschließend gefriergetrocknet. Beim Pferd und Schwein wurde der Darminhalt aus dem Caecum und beim Rind aus dem Pansen entnommen. Der Caecum ist, wie der Pansen, die Region im Darmtrakt, in der sich die höchste Dichte und Vielfalt an Mikroorganismen befindet. Daher kann angenommen werden, dass im restlichen Darmtrakt keine anderen Ergebnisse zu erwarten sind.

#### Cositec-Puffer

Der Puffer wird nach den in Tabelle 2-29 aufgeführten Substanzen und Konzentrationen hergestellt. Die Salze wurden in deionisiertem Wasser gelöst, wobei Calciumchlorid in einem separaten Gefäß gelöst wird. Die Lösungen werden zum Schluss vereinigt. Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt.

**Tabelle 2-29: Zusammensetzung des Cositec-Puffers**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
NaCl	115
KCl	10
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	2,5
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	2,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
NaHCO <sub>3</sub>	25
NH <sub>4</sub> Cl	5

**Pansen-Puffer**

Der Pansen-Puffer wird aus den in Tabelle 2-30 aufgeführten Substanzen hergestellt. Die Salze werden in deionisiertem Wasser gelöst, wobei Calciumchlorid in einem separaten Gefäß gelöst wird. Die Lösungen werden vereinigt. Der pH-Wert beträgt 7,4.

**Tabelle 2-30 Zusammensetzung des Pansen-Puffers**

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration [mM]</b>
NaCl	28
KCl	7,69
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,63
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0,216
1 N HCL	5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12H <sub>2</sub> O	10
NaHCO <sub>3</sub>	97,9
NH <sub>4</sub> Cl	5

**2.2.27.1. Vorversuche zur Methoden-Verifizierung****Einfluss des Puffers**

Als erstes wird der Einfluss des Puffers getestet. Dazu wird 1,5 g gefriergetrockneter Darminhalt in 150 mL deionisiertem Wasser bzw. Cositec-Puffer aufgekocht und

anschließend filtriert. Danach erfolgt eine Bestimmung der reduzierenden Enden nach der Methode nach Somogyi und Nelson und eine 2-Propanol-Fällung. Als Negativprobe wird der Puffer vermessen.

#### *Einfluss des Darminhaltes*

Die Nachweisbarkeit des Scleroglucans wird anhand einer Konzentrationsreihe getestet. Dazu werden in einem 50 mL Röhrchen jeweils 40 mL Scleroglucanlösung mit den Konzentrationen 0, 0,5, 1, 1,5, und 2 g/L mit 0,5 g gefriergetrocknetem Darminhalt versetzt. Das Gemisch wird dann 24 h in einem Überkopfschüttler bei 38 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 g. Der Überstand wird dekantiert und erneut zentrifugiert. Diese Überstände werden auf ihren Polysaccharidgehalt getestet.

### **2.2.27.2. Batch-Versuche mit Darminhalt**

#### *Batch mit Pferde- und Schweinedarminhalt*

Für den Batch-Versuch mit Darminhalt werden 150 mL Scleroglucan mit den Salzlösungen und pH 7,2 des Cositec-Puffers (Tabelle 2-29) in einer 500 mL Schottflasche mit 1,5 g gefriergetrocknetem Darminhalt versetzt. Der Darminhalt wird in ein Nylonsäckchen gegeben, das mit einem Kabelbinder verschlossen wird. Die Inkubation erfolgt bei 38 °C für 24 h bei kontinuierlicher Vermischung durch einen Magnetrührer. Die Proben werden zweimal 15 min bei 12.000 g zentrifugiert und der Überstand für die weiteren Analysen verwendet. Zur Korrektur der Messwerte wird unter den gleichen Bedingungen ein Ansatz mit Cositec-Puffer statt Scleroglucanlösung inkubiert, bei der die Proben die gleiche Behandlung erfahren. Die ermittelten Werte auf der 2-Propanolfällung und aus der Bestimmung der reduzierenden Enden werden von den Proben mit Glucan abgezogen, um den Einfluss des Darminhaltes zu Bestimmen.

#### *Batch mit Panseninhalt vom Rind*

Für den Batch-Versuch mit Panseninhalt wird wie bei dem Batchversuch für Pferde- und Schweinedarminhalt vorgegangen. Anstelle des Cosites-Puffers wird der für den Pansen (Tabelle 2-30) verwendet.

### **2.2.28. ELISA zur Bestimmung von Zytokinen**

Es wurde der Einfluss des Molekulargewichts von Scleroglucan auf die Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 durch MODC's getestet. Die Zytokine wurden durch einen Sandwich ELISA der Firma R&D Systems GmbH (Wiesbaden, Deutschland) gemessen. In die Vertiefungen der Maxisorp Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurde der Fänger-Antikörper Maus anti-Schwein TNF- $\alpha$ , Ziege anti-Schwein IL-6 oder Maus anti-Schwein IL-10 gebunden, bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die Platte wurde mit 1 % (w/v) BSA stabilisiert mit 0,05 % (w/v) NaN<sub>3</sub> in PBS für 2 h bei RT. Nach jedem Inkubationsschritt werden die Platten dreimal mit PBS und 0,05% (w/v) Tween 20 gewaschen. 200  $\mu$ L des MODC Überstandes oder des Standards rpTNF- $\alpha$  (300 ng/ml), rpIL-6 (150 ng/ml) und rpIL-10 (200 ng/ml) werden in die Vertiefungen gegeben und bei RT für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation für 2 h bei RT mit dem biotyniliertem Ziege anti-Schwein IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  Detektions-Antikörper. Nach dem Waschen werden 200  $\mu$ L HRP-konjugiertes Streptavidin in die Vertiefungen gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wird zum Färben 15 min mit TMB inkubiert. Die Reaktion wird mit 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Gemessen wird die Absorption bei 450 nm.

### **2.2.29. ELISA zur Bestimmung von Immunglobulinen im Blutplasma**

Die Plasmaproben aus dem ersten Fütterungsversuch werden mit Hilfe eines kommerziellen Kits auf den Anteil der Immunglobuline G, A und M untersucht. Bei dem Fütterungsversuch wird den Tieren vor Beginn und nach 5-wöchiger Laufzeit des Versuches eine Blutprobe entnommen. Der Anteil der Immunglobuline A, G und M in der Plasmaprobe wird mit Hilfe des kommerziellen Test-Kits der Firma Bethyl, Montgomery, USA gemessen. Der Sandwich ELISA wird bei Raumtemperatur in Maxisorp Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Von dem Fänger-Antikörper werden pro Vertiefung 1  $\mu$ L Antikörper auf 100  $\mu$ L Bindungspuffer (NaBicarbonat, pH 9,6) gegeben und 60 Minuten inkubiert. Nach jeder Inkubationszeit wird die Platte dreimal mit PBS + 0.1 % (v/v) Tween 20 gewaschen. Nach der Bindung des Fänger-Antikörpers folgt mit Hilfe von PBS mit 1% (w/v) BSA (200  $\mu$ L pro Vertiefung) das Blocken von unspezifischen Bindungen des Antigens an der Platte. Geblockt wird für 60 Minuten. Es werden pro Plasmaprobe 100  $\mu$ L mit folgenden Verdünnungen in die Vertiefungen gegeben: IgG 1:10.000, IgA und IgM 1:3.000. Die Verdünnung erfolgt in PBS mit 1% (w/v) BSA und 0,05 % (v/v) Tween 20. Die Inkubationszeit beträgt 60 Minuten. Nach dem Waschen wird der Detektions-Antikörper in



die Vertiefungen gegeben, mit einer IgA-Konzentration von 1:75.000, IgG 1:50.000 und einer IgM-Konzentration von 1:50.000. Nach 60 Minuten Inkubationszeit bei RT wird die Platte gewaschen. Anschließend erfolgt eine Visualisierung der Bindung mit 100 µL TMB Substrat. Die Färbereaktion wird gestoppt durch die Zugabe von 100 µL 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Absorption wird bei 450 nm mit dem Mikrotiter Platten Leser SUNRISE (Tecan, Crailsheim, Germany) gemessen.

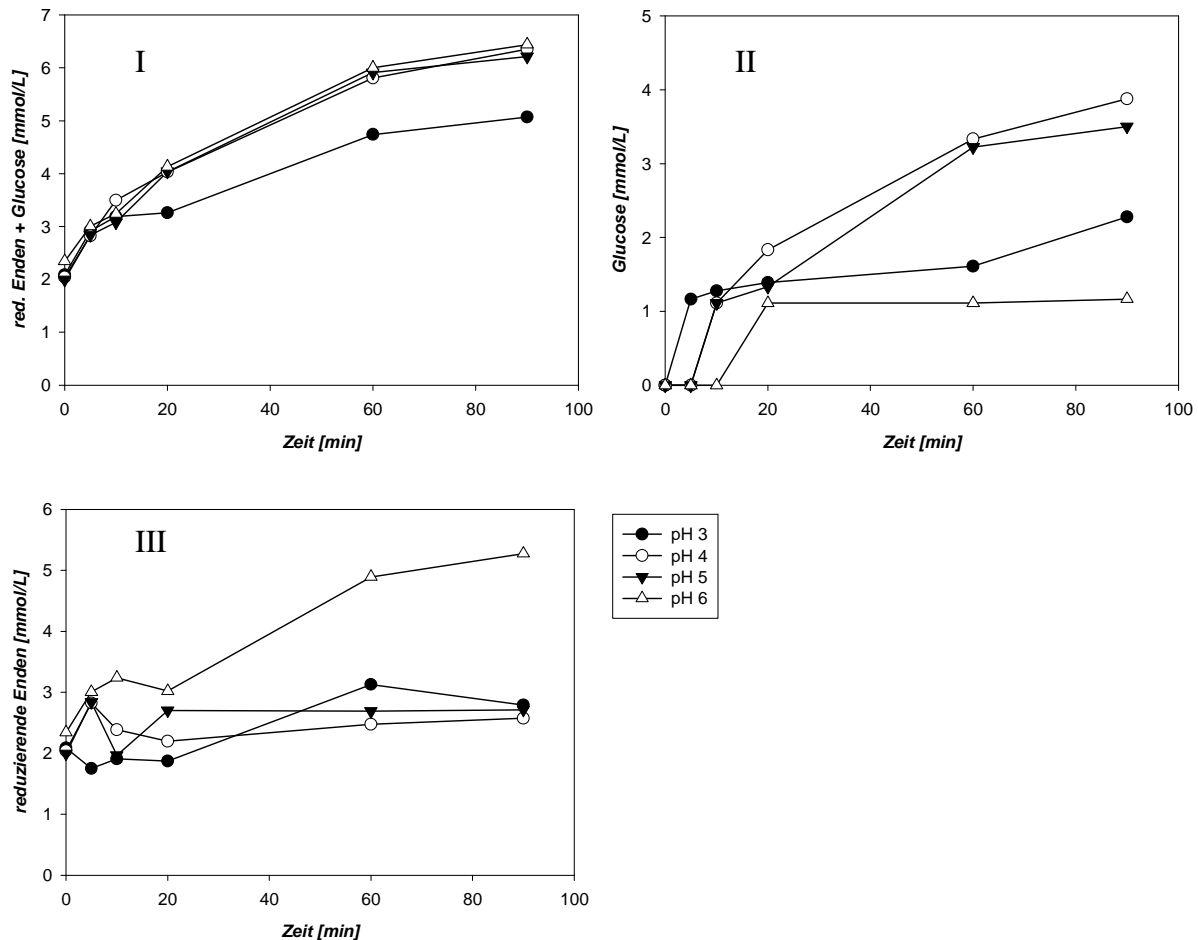
### 3. Ergebnisse

Primäres Ziel dieser Arbeit ist ein Enzym zu finden, welches möglichst Endoglucanaseaktivität besitzt, so dass durch statistische Spaltung Scleroglucan-Fragmente in verschiedenen Molekulargewichtsbereichen entstehen. Die Verfütterung von Scleroglucan in verschiedenen Molekulargewichtsgrößen an Ferkel und die Untersuchung der immunologischen Effekte sind im Folgenden dargestellt. Die Produktion von Oligosacchariden setzt eine genaue Bestimmung der Molekulargewichtsgröße und -verteilung voraus. Dazu wird eine Nachweismethode entwickelt und etabliert. Die Herstellung der Molekulargewichtsfractionen wird durch den Test von kommerziell erhältlichen Enzymen und thermischer Behandlungen untersucht. Neben den kommerziellen Enzymen wird die Produktion von Glucanasen mit *T. harzianum* untersucht sowie die rekombinante Produktion in *E. coli*. Zur Charakterisierung der Effekte auf das Immunsystem werden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Versuche durchgeführt. Ausgehend von diesen Ergebnissen wird der Abbau von Scleroglucan im Magendarm von Schwein, Rind und Pferd untersucht, sowie der Transport durch die Darmwand des Schweins.

#### 3.1. Methodenentwicklung für den Nachweis der Hydrolyse von Scleroglucan

Zu Beginn der Untersuchung wurden Enzymgemische mit Endo- und Exoglucanaseaktivität herangezogen, welche in der Industrie in anderen Bereichen Anwendung finden (z.B. AS 100 für den Vorverdau von Kükenfutter) und somit günstig und in großen Mengen erhältlich sind, um die Hydrolyse auch in einem größeren Maßstab ökonomisch durchführen zu können.

Eine Grundidee war es, durch unterschiedliche Hydrolyse-Bedingungen, Variation des pH-Wertes und der Temperatur die Reaktionsbedingungen so zu verändern, dass die Exoglucanaseaktivität möglichst gering ist, also wenig Glucose freigesetzt wird. Gleichzeitig werden diese Untersuchungen für die Methodenentwicklung zum Nachweis des Hydrolyseerfolges herangezogen. In Abbildung 3-1 sind ausführlich die einzelnen Untersuchungen für die Variation des pH-Wertes dargestellt. Dabei wurde eine Scleroglucanlösung mit einer Konzentration von 1 g/L verwendet, der jeweilige pH-Wert wurde mit Ameisensäure oder Natriumhydroxid eingestellt. Die Glucoseäquivalente lagen zu Beginn des Versuches bei ca. 2 mmol/L und die Glucose bei 0 mmol/L.



**Abbildung 3-1: Enzymatische Hydrolyse von Scleroglucan mit AS 100 bei unterschiedlichen pH-Werten: Graph I zeigt den Verlauf der reduzierenden Enden insgesamt, Graph II den Verlauf der Glucose und Graph III die reduzierenden Enden vom Glucan.**

Nach der Hydrolyse über 90 min mit Probenahme nach 0, 5, 10, 20, 60 und 90 min wurden als erstes die reduzierenden Enden bestimmt (Abbildung 3-1 I). Es ist für alle untersuchten pH-Werte 3, 4, 5 und 6 eine Zunahme der reduzierenden Enden zu erkennen. Allerdings kann daraus noch nicht auf eine Exo- oder Endoglucanaseaktivität geschlossen werden, da bei der Bestimmung der reduzierenden Enden sowohl die Bestimmung der reduzierenden Enden am Glucan also auch die der freien Glucose erfolgt. Die Werte enthalten sowohl die der freien Glucose und die der Scleroglucan-Fragmente. Um eine Differenzierung zwischen Glucose und Scleroglucan-Fragmenten vornehmen zu können, muss der Gehalt an freier Glucose bestimmt werden. Diese wurde enzymatisch mit dem Akkutrendsystem bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-1 II graphisch dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die unterschiedlichen pH-Werte einen stärkeren Einfluss auf die Bildung der freien Glucose im Vergleich zur Bildung der reduzierenden Enden haben. Bei pH 3 und 4 ist ein Anstieg der freien Glucose über die 90 min von 1 mmol/L auf ca. 3,5 mmol/L zu erkennen. Bei den pH-

Werten 3 und 6 hingegen zeigt sich ein anderer Verlauf. Im Falle von pH 6 ist kein signifikanter Anstieg zu sehen und bei pH 3 erfolgt dieser nur auf 2 mmol/L.

Durch Subtraktion der ermittelten freien Glucose von den vorab ermittelten Werten der red.Enden, werden die reduzierenden Enden am Polysaccharid bestimmt. Dieser Verlauf ist in Abbildung 3-1 III dargestellt. Im Hydrolysezeitraum von 0 bis 20 min zeigen sich die stärksten Unterschiede in der freien Glucoseproduktion (Exoglucanaseaktivität). Nach 60 und 90 min ist kaum ein Unterschied zwischen den pH-Werten zu erkennen; lediglich bei pH 6 ist eine vermehrte Endoglucanase-Aktivität zu vermuten. Da die enzymatische Bestimmung der freien Glucose über einen Blutzucker-Teststreifen erfolgte und dieses kein wissenschaftlich anerkanntes Verfahren darstellt, wurde in dieser Arbeit als Alternative eine GPC-Methode entwickelt. Die Ergebnisse der Methodenetablierung sind im Folgenden ausführlich dargestellt.

## **3.2. Gelpermeationschromatographie**

Das in dieser Arbeit untersuchte Polysaccharid Scleroglucan wird in unserer Arbeitsgruppe produziert und aufgereinigt. Abtrennung der Zellen und Reinigung der zellfreien Produktlösung erfolgen mittels Querstromfiltration. Während der gesamten Aufarbeitung wird das Produkt zur Stabilisierung mit 5 g/L Ameisensäure versetzt.

Neben dem Polysaccharid Scleroglucan enthält das Ausgangsprodukt somit Ameisensäure sowie unterschiedliche Restmengen an Glucose, Protein und weiteren Medienbestandteilen.

### **3.2.1. Optimierung der Messbedingungen**

#### **3.2.1.1. Eluent**

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurde zunächst als Eluent eine  $\text{NaNO}_3$ -Lösung verwendet. Es folgten weitere Tests mit Phosphatpuffer und anschließend  $\text{NaN}_3$ . Da die Messung auf wässriger Basis verläuft und keine Trennungsunterschiede zwischen den Laufmitteln erkennbar waren, wurde konserviertes Wasser (0,2 g/L  $\text{NaN}_3$ ) als Laufmittel für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Der Zusatz von  $\text{NaN}_3$  dient zum Schutz der Anlage vor Algenbewuchs.

#### **3.2.1.2. Flussrate**

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Optimierung ist die Einstellung der Flussrate. Der Einfluss der Flussrate wird anhand einer Pullulan-Kalibrierung verdeutlicht. In der folgenden Abbildung 3-2 ist eine Kalibrierfunktion mit 1 mL/min und 0,5 mL/min Flussrate gezeigt.

Die Kalibrierung erfolgt mit Pullulan-Standards von 342 g/mol – 1.660.000 g/mol. Die Lösung des Standards erfolgt über einen Zeitraum von mindestens 14 h im Eluenten (0,2 g/L  $\text{NaN}_3$ ). Die hochmolekularen Standards (1.660.000 g/mol; 778.000 g/mol) werden mit einer Konzentration von 0,5 g/L, jene mit einem Molekulargewicht von 410.000 g/mol bis 48.400 g/mol mit einer Konzentration von 1 g/L und die niedermolekularen mit einer Konzentration von 3 g/L angesetzt und gemessen. Die unterschiedlichen Konzentrationen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht gehen auf Empfehlungen der Herstellerfirma zurück, um zum einen eine Überladung der Säule zu vermeiden und zum anderen, um ein Detektorsignal zu erhalten mit dem eine Auswertung über einen RI-Detektor und Viskositätsdetektor möglich ist.

Für die Kalibrierungen ergeben sich folgende Funktionen:

a) 1 mL/min  $y = 67,9 - 7,19 x + 0,276 x^2 - 3700 x^3$

b) 0,5 mL/min  $y = 14,8 + 0,43 x - 802 x^2 + 1700 x^3$

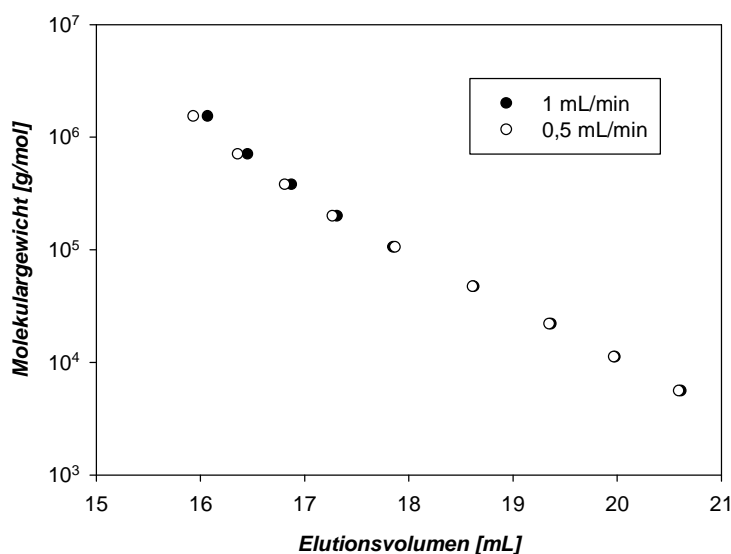


Abbildung 3-2: Pullulan Kalibrierung mit einem RI-Detektor

Es ist zu erkennen, dass die Flussrate einen Einfluss auf die Trennung der hochmolekularen Substanzen hat. Eine bessere Trennung erfolgt bei einer Flussrate von 0,5 mL/min als bei einer von 1 mL/min. Da die Glucane ein erwartetes Molekulargewicht von  $6-12 \times 10^6$  g/mol besitzen, erfolgten alle weiteren Messungen bei einer Flussrate von 0,5 mL/min.

### 3.2.1.3. Einfluss der Probensubstanz

Da ein technisch aufgereinigtes und mit Ameisensäure stabilisiertes Produkt vorliegt, stellte sich die Frage, ob Salze und andere niedermolekulare Substanzen das Elugramm beeinflussen.

Um dieses zu untersuchen, wurde eine Reaktorprobe aus der Scleroglucan-Produktion entnommen und ohne weitere Vorbehandlung aufgearbeitet. Das Polysaccharid wurde von den Zellen abgetrennt. Ein Teil wurde mit 5 g/L Ameisensäure versetzt. Davon wurde eine Probe direkt und eine weitere nach Dialyse gegen den Eluenten (0,2 g/L  $\text{NaN}_3$ ) vermessen. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 3-3 (schwarze Linien) dargestellt. Der andere Teil wurde ohne vorherigen Zusatz von Ameisensäure nach derselben Methode mit der GPC vermessen, wobei ebenfalls die Aufteilung der Probe in dialysierten und nicht dialysierten Teil erfolgte. In der Abbildung 3-3 ist zu erkennen, dass die unbehandelte Polysaccharidprobe (rote Kurve) und die stabilisierte Probe (schwarze Kurve) sehr unterschiedliche Elugramme ergeben. Die in diesen Proben enthaltenen niedermolekularen Substanzen führen zu einer verfälschten Darstellung, es erscheinen Peaks in einem hochmolekularen Bereich, die nicht auf hochmolekulare Substanzen zurückzuführen sind. Es ist aber deutlich zu erkennen, dass sich durch die Dialyse gegen den Eluenten bei beiden Proben das gleiche Elugramm ergibt. Daraus folgt, dass für weitere Untersuchungen mit Hilfe der GPC eine Dialyse der Proben gegen den Eluenten erfolgen sollte.

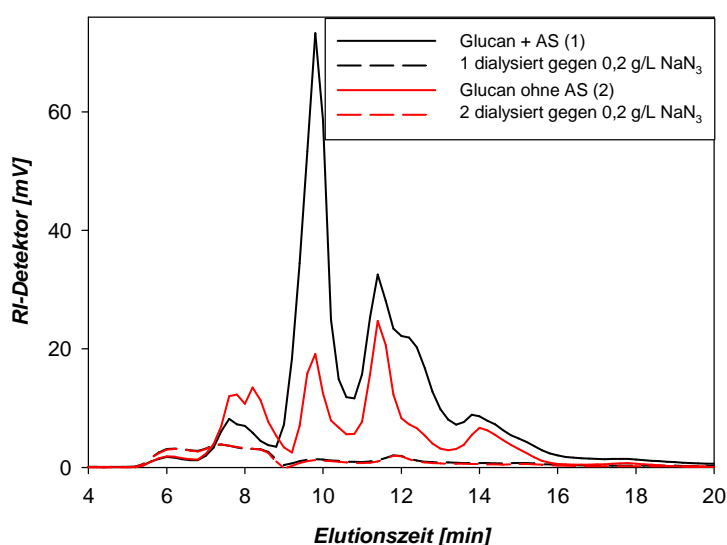


Abbildung 3-3: Chromatogram unterschiedlich aufgereinigter zellfreier Glucanlösungen, AS = Ameisensäure 5 g/L

### 3.2.1.4. Zusammenfassung der Messbedingungen

Zusammenfassend ergeben sich folgende Messbedingungen:

Eluent:	0,2 g/L NaN <sub>3</sub>	} Experimentell ermittelt,
Flussrate:	0,5 mL/min	
Säulentemperatur:	75°C	} Aus der Literatur übernommen.
Injektionsvolumen:	100 µL	

### 3.2.2. Kalibrierung über den RI-Detektor

Die Entwicklung einer GPC-Methode für den Nachweis von Polysacchariden wurde vorgenommen, um eine Molekulargewichtsverteilung zu bestimmen und darüber eine bessere Charakterisierung von Glucanasen durchführen zu können. Daher ist eine Kalibrierung gegen einen chemisch ähnlichen Stoff, der ein zu erwartendes gleiches hydrodynamisches Volumen wie das Scleroglucan aufweist, zu verwenden. Im optimalen Fall erfolgt die Kalibrierung mit Größenstandard aus dem Stoff, der untersucht werden soll.

#### 3.2.2.1. Bestimmung des Molekulargewichts

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgt über Pullulan-Standards von 342 – 1.540.000 g/mol. Glucose (180 g/mol) wird als Standard mit in die Kalibrierung aufgenommen.

In der Abbildung 3-4 ist eine Kalibrierung mit Pullulan-Standards und Glucose dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass mit dem Standard ein Bereich von 16 – 24 mL Elutionsvolumen abgedeckt ist. Die zu untersuchende Probe sollte sich in diesem Bereich befinden.

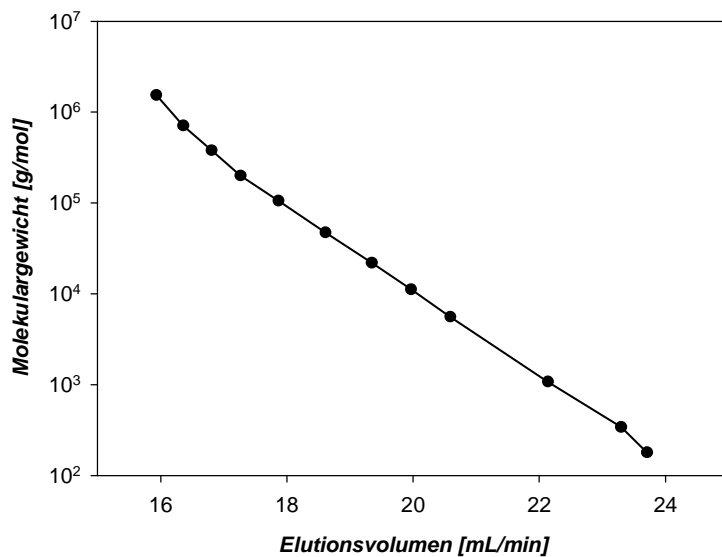


Abbildung 3-4: Kalibrierung der GPC mit Standards von 180 bis 1.540.000 g/mol

### 3.2.2.2. Quantitative Bestimmung der Glucose

Um eine alternative Glucosebestimmung gegenüber der enzymatischen mittels Glucoseteststreifen zu erhalten, wurde die GPC herangezogen. Da die Glucosekonzentration bei vollständiger Hydrolyse der eingesetzten Probe von 1 g/L Scleroglucan diesen Wert nicht überschreiten kann, wurde dieser als maximale Glucosekonzentration gesetzt. Es erfolgte eine Abstufung in 0,1 g/L-Schritten. In Abbildung 3-5 ist in dem einen Diagramm das zugehörige Elugramm dargestellt. In der rechten Abbildung ist die daraus resultierende lineare Kalibrierungsfunktion zu sehen. Hierbei ist die Glucosekonzentration gegenüber der Peak-Fläche aufgetragen. Die Bestimmung der Glucosekonzentration mittels GPC ist also möglich und kann auf die Hydrolyseproben angewendet werden.

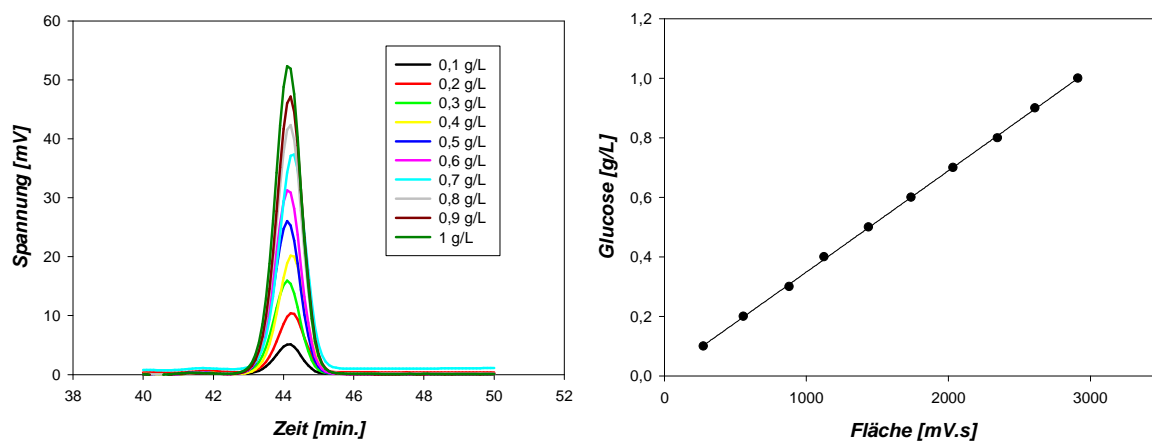


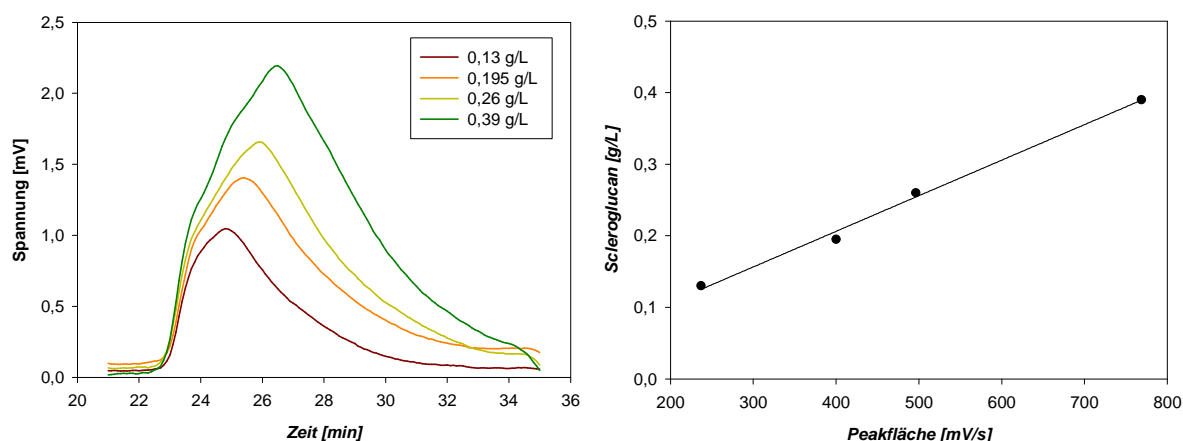
Abbildung 3-5: links: Elugramm unterschiedlicher Glucosekonzentrationen; rechts: Kalibrierfunktion (Konzentration gegen Peakfläche aufgetragen)



### 3.2.2.3. Quantitative Bestimmung des Scleroglucans

Die konventionelle Methode der quantitativen Bestimmung des Scleroglucans ist die Gravimetrie. Diese Methode ist sehr zeitaufwendig. Aus diesem Grund wurde geprüft, ob eine quantitative Bestimmung auch mit Hilfe der GPC erfolgen kann.

Dazu wurde eine genau definierte Ausgangslösung verdünnt und mittels des standardisierten Verfahrens vermessen. Parallel dazu wurden die Konzentrationen der Verdünnungen gravimetrisch über Fällung und Trocknung bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 3-6 dargestellt.



**Abbildung 3-6:** Links Elugramme der unterschiedlich konzentrierten nativen Scleroglucanlösungen. Rechts Kalibrierungsfunktion der Konzentration gegen die Peakfläche.

Es zeigte sich, dass eine quantitative Bestimmung mittels GPC möglich ist. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass für jede produzierte Charge eine Kalibrierung erfolgen muss, da das Elugramm in Abhängigkeit von der Molekulargewichtsverteilung ein anderes Verhalten zeigen kann.

### 3.2.3. Universelle Kalibrierung

Wie schon erwähnt, ist die Trennung in der GPC abhängig vom hydrodynamischen Volumen ( $V_h$ ) der Substanzen. Damit ist eine konventionelle Kalibrierung (Auswertung berücksichtigt nur den Elutionszeitpunkt) stark abhängig von den chemischen Eigenschaften des Stoffes. Existieren eng verteilte Standards für den zu untersuchenden Stoff, kann diese angewendet werden. Soll eine Substanz untersucht werden, für die keine Standards existieren oder nur Substanzen mit ähnlichem  $V_h$ , stößt die konventionelle Kalibrierung an ihre Grenzen. Dann können nur noch bedingt Aussagen über das Molekulargewicht getroffen werden.

Bei der universellen Kalibrierung wird der Zusammenhang zwischen intrinsischer Viskosität und Molekulargewicht genutzt, welches dazu führt, dass chemisch unterschiedliche Substanzen auf einer Kalibrierkurve liegen. Bei der universellen Kalibrierung wird das Molekulargewicht mit der intrinsischen Viskosität multipliziert und gegenüber dem Elutionsvolumen aufgetragen.

### 3.2.3.1. Pullulan

In Abbildung 3-7 ist die Pullulankalibrierkurve als universelle Kalibrierung unter Einbeziehung der intrinsischen Viskosität abgebildet. Verwendet wurde ein Polynom dritter Ordnung. Die Kalibrierfunktion kann nun verwendet werden, um Molekulargewichte von Substanzen zu berechnen, die ein anderes hydrodynamisches Volumen besitzen als der Standard Pullulan.

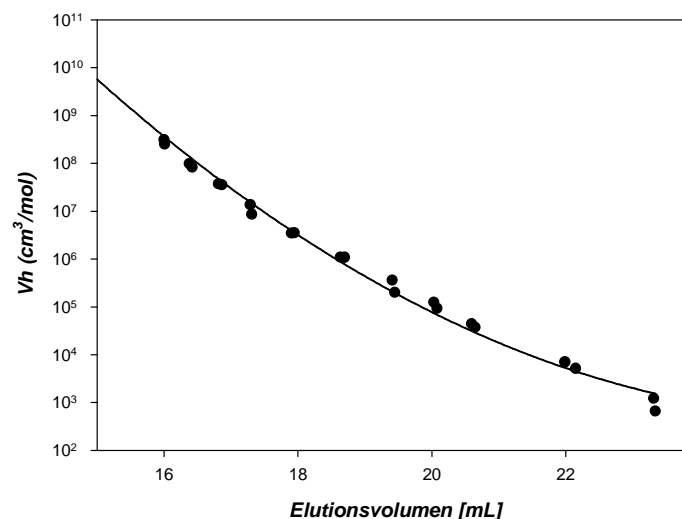


Abbildung 3-7: Universelle Kalibrierkurve der Pullulan-Standards.

### 3.2.3.2. Berechnung des Stützpunktes

Bei der Molekulargewichtsbestimmung des nativen Scleroglucans trat das Problem auf, dass die kommerziell erwerbbaren Standards während der Erstellung der Arbeit bei 1.540.000 g/mol endeten. Das zu untersuchende Produkt hat jedoch ein zu erwartendes Molekulargewicht von  $6 - 12 \cdot 10^6$  g/mol und liegt damit deutlich über dem kalibrierten Bereich. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Extrapolation der Kalibrierkurve in den hochmolekularen Bereich zu „erweitern“. Dazu wurde ein „künstlicher“ Kalibrierpunkt im hochmolekularen Bereich geschaffen, der im Folgenden als Stützpunkt (Hilfspunkt) bezeichnet wird. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Abbildung 3-8 ist eine konventionelle Kalibrierung der Pullulanstandards dargestellt. Konventionelle Kalibrierung bedeutet, dass ein Molekulargewicht gegenüber dem Elutionsvolumen aufgetragen ist. Durch die Punkte des hochmolekularen Bereiches wird eine Gerade gelegt und abgelesen, welches Molekulargewicht bei 12 mL Elutionsvolumen vorliegt.

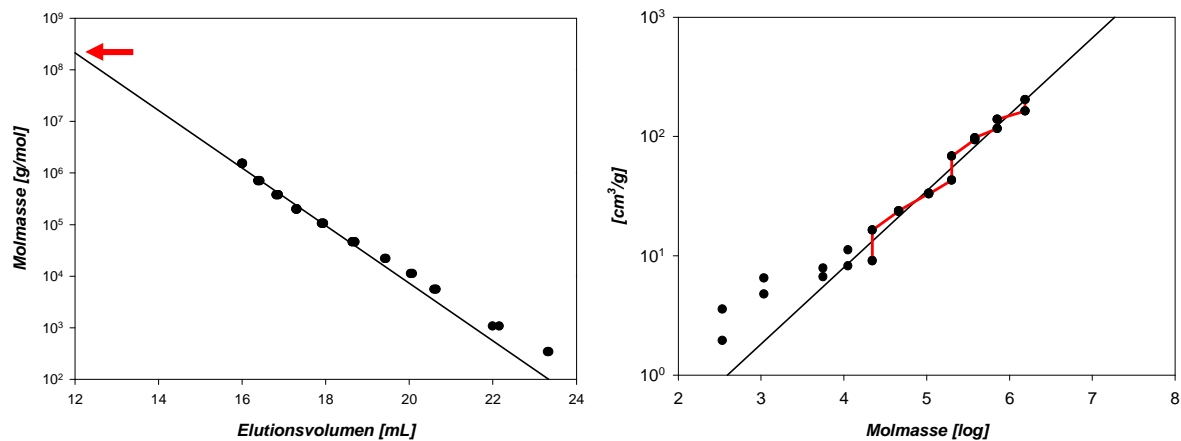


Abbildung 3-8: links: Kalibriergerade im hochmolekularen Bereich; rechts: zugehöriger Mark-Houwink-Plot

Das so erhaltene Molekulargewicht ( $8,3 \cdot 10^8$  g/mol) wird für die weitere Berechnung verwendet. Die Berechnung der intrinsischen Viskosität  $[\eta]$  erfolgt über die Mark-Houwink-Beziehung.

$$[\eta] = K \cdot M^\alpha \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Die Mark-Houwink-Parameter werden aus der universellen Kalibrierung ermittelt. Der dazugehörige Plot ist in

Abbildung 3-8 (rechts) dargestellt. Die so erhaltenen Werte:

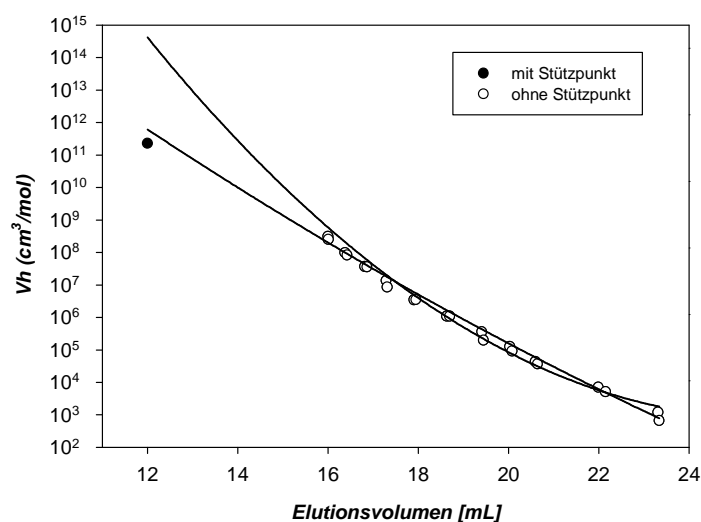
$$K = 0,022896 \text{ [cm}^3\text{/g]}$$

$$\alpha = 0,644$$

werden in die Gleichung 3-1 eingesetzt. Die berechnete intrinsische Viskosität  $[\eta]$  für einen Stützpunkt bei 12 mL liegt demnach bei

$$2,289 \cdot 10^{-2} \cdot (1,67 \cdot 10^8)^{0,644} = 4396 \text{ cm}^3\text{/g} = [\eta]$$

Diese intrinsische Viskosität kann nun verwendet werden, um eine universelle Kalibrierung mit dem Stützpunkt zu erstellen. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 3-9 beide Kalibrierkurven dargestellt.



**Abbildung 3-9: Kurvenapproximation der universellen Kalibrierung mit und ohne Stützpunkt.**

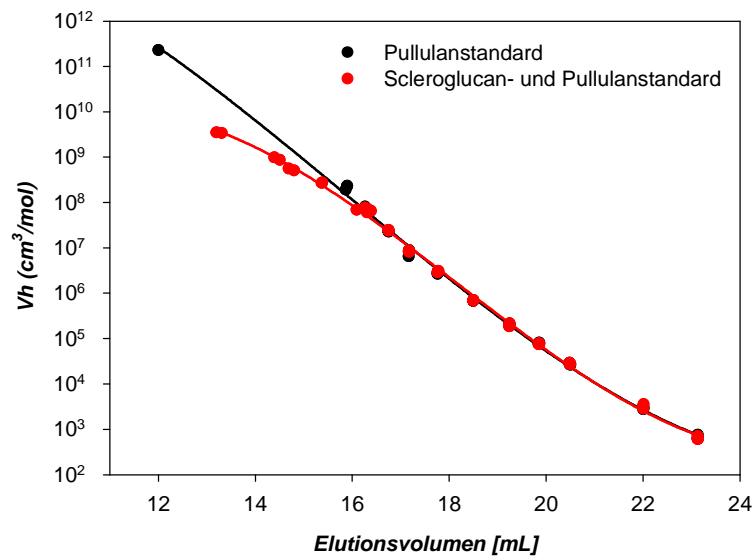
### 3.2.3.3. Universelle Kalibrierung mit Scleroglucan-Standards

Durch Ultraschallabbau ist es gelungen, Scleroglucan-Standards aus selbst produziertem und aufgereinigtem Scleroglucan herzustellen. Das native Scleroglucan wurde unterschiedlich beschallt (Kapitel 2.2.21) und von den so erhaltenen Fraktionen wurde das Molekulargewicht mittels Lichtstreuendetektor bestimmt. Das ermittelte Gewichts- und Zahlenmittel ist in der Tabelle 3-1 zusammengefasst.

**Tabelle 3-1: Gewichtsmittel (Mw) und Zahlenmittel (Mn) des Ultraschall behandelten Scleroglucan gemessen mit Lichtstreuendetektor**

Probenbezeichnung	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)
Ultraschall 1 min	712.850	835.200
Ultraschall 2 min	555.250	698.000
Ultraschall 5 min	412.950	598.200
Ultraschall 20 min	236.300	418.300
Ultraschall 30 min	274.650	389.950

Die Fraktionen wurden mit der GPC und dem Viskositätsdetektor vermessen und das Molekulargewicht (Tabelle 3-1) aus der Lichtstreuungsmessung wurde für die Proben eingesetzt. In der Abbildung 3-10 ist die universelle Kalibrierung mit den Pullulanstandards jeweils unter Verwendung des Stützpunkts bzw. Scleroglucansstandards dargestellt.



**Abbildung 3-10: Kurvenapproximation der universellen Kalibrierung. Schwarz: Pullulanstandards mit Stützpunkt. Rot: Pullulan- und Scleroglucanstandards ohne Stützpunkt.**

Das Einbetten der Ultraschall behandelten Scleroglucanproben zeigt, dass die universelle Kalibrierung anwendbar ist und für weitere Molekulargewichtsbestimmungen verwendet werden kann. Ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den Pullulan und Scleroglucan-Standards ist die Viskosität der Probe bei ähnlichem Gewichtsmittel (Tabelle 3-2). Scleroglucan weist bei ähnlichem Molekulargewicht gegenüber Pullulan eine viel höhere intrinsische Viskosität auf.

**Tabelle 3-2: Pullulan und Scleroglucan mit ähnlichem Gewichtsmittel aber unterschiedlicher intrinsischer Viskosität**

	Mw [g/mol]	Viskosität [mL/g]
Pullulan	1.540.000	148
Scleroglucan	1.663.500	2.100

### 3.3. Modifizierung von Scleroglucan

Das Produkt des Pilzes *Sclerotium rolfsii*, Scleroglucan, sollte für Versuche am Modellorganismus Schwein verändert werden. Zum einen sollten definierte Molekulargewichtsfractionen hergestellt, zum anderen eine Fluoreszenz-Markierung vorgenommen werden, um bei weiteren Versuchen eine neue alternative Nachweismethode zu schaffen.

### 3.3.1. Enzymatische Hydrolyse

Für die enzymatische Hydrolyse wurden verschiedene kommerziell erwerbbar Enzyme und Enzymgemische getestet. Aufgrund der Vielzahl von Daten wird nicht von jedem Enzym der komplette Hydrolyseverlauf dargestellt.

#### Proteingehalt der Enzyme

Da es sich bei den meisten Enzymen um Gemische handelt, die ursprünglich für eine andere Anwendung eingesetzt wurden, wie z. B. das AS 100 als Enzymmischung für den Vorverdau von Kükenfutter, ist eine Charakterisierung erforderlich. Dazu wird die Proteinkonzentration nach Lowry bestimmt und eine SDS-PAGE durchgeführt.

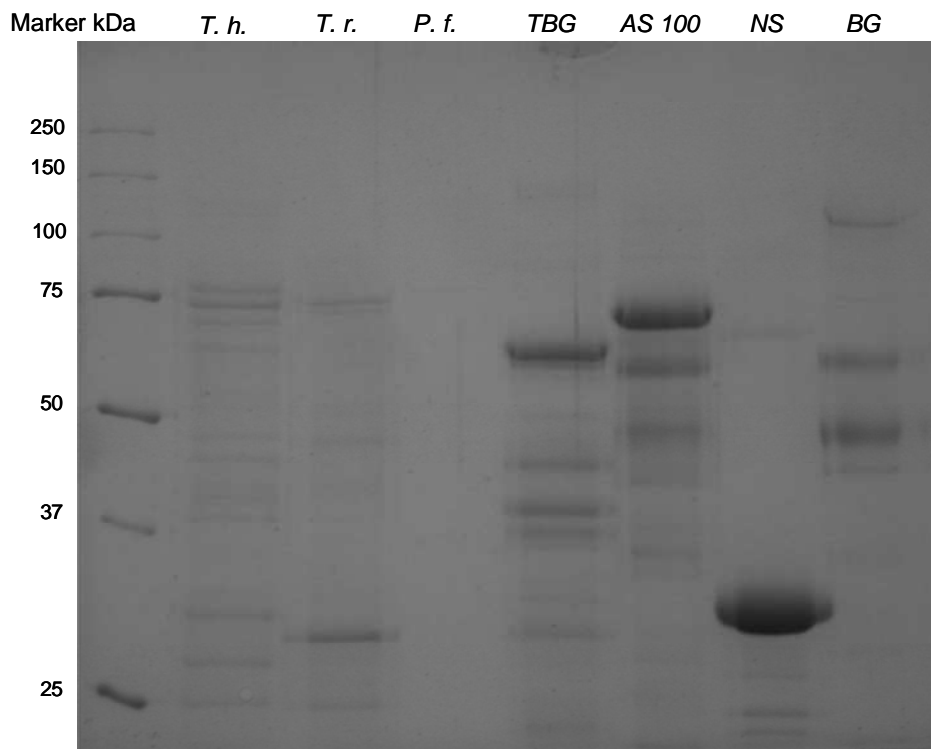


Abbildung 3-11: Ergebnis der SDS-PAGE nach Auftragung unterschiedlicher Enzymgemische. Folgende  $\beta$ -Glucanasen wurden eingesetzt: *T. h.* = von *Trichoderma harzianum* (Fa. Erbslöh), *T. r.* = von *Trichoderma reesei* (Fa. Erbslöh), *P. f.* = von *Penicillium funiculosum* (Fa. Erbslöh), TBG = Optimash<sup>TM</sup> TBG (Fa. Genencor), AS 100 = CelluPract AS 100 (Fa. Biopract), NS = Optimash<sup>TM</sup> NS (Fa. Genencor), BG = Optimash<sup>TM</sup> BG (Fa. Genencor)

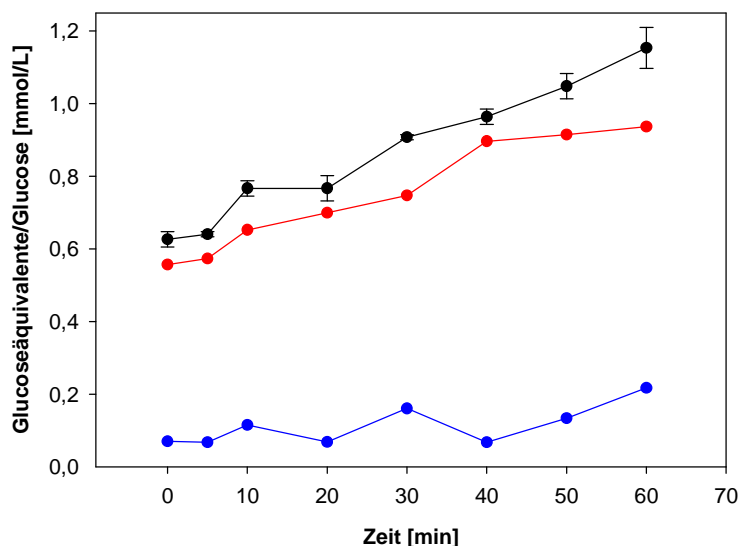
Die Enzymgemische *T. harzianum*, *T. reesei* und *P. funiculosum* zeigen Banden in dem Bereich von 25 – 75 kDa. Bei *T. harzianum* ist eine etwas intensivere Bande im Bereich von 75 kDa zu sehen, bei *T. reesei* etwa im Bereich von 30 kDa.

Bei den Enzymgemischen der Firma Optimash™ TBG und NS ist jeweils eine intensivere Bande bei circa 70 kDa (TBG) und bei etwa 30 kDa (NS) zu beobachten. Bei dem Gemisch BG sind zwei etwa gleich starke Banden bei 50 und 70 kDa zu erkennen.

Die vorgenommene Untersuchung läßt keine eindeutige Zuordnung der Banden zu einer Glucanase zu. Aus diesem Grund wird für die Berechnung der Glucanaseaktivität die ermittelte Proteinkonzentration verwendet. Von den hochreinen  $\beta$ -Glucanasen der Organismen *Helix pomatia*, *Bacillus subtilis* und *Trichoderma species* (Laminarinase) und den Enzymen GH16 und GH81 aus dem Organismus *Clostridium thermocellum* wurden keine SDS-PAGE durchgeführt, da es sich hier um aufgereinigte Proteine mit einer genauen Angabe der Aktivität handelt.

#### Hydrolyse mit Laminarinase aus *T. species*

Am Beispiel der Laminarinase aus *Trichoderma species* ( $\beta$ -Glucanase, Sigma Aldrich) werden die Hydrolyse und das Vorgehen bei der Auswertung gezeigt. Für die Hydrolyse wurden 0,324 U Enzym eingesetzt. Das Scleroglucan hatte eine Konzentration von 0,45 g/L und einen pH-Wert von 4,0. Die Hydrolyse wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37 °C durchgeführt, alle 10 Minuten erfolgte eine Probennahme (Abbildung 3-12).



**Abbildung 3-12:** Verlauf der Hydrolyse von Scleroglucan (0,45 g/L) mit Laminarinase; schwarz: Zunahme der reduzierenden Enden (Somogyi & Nelson); rot: Glucosemenge mittels GPC bestimmt; blau: Differenz der reduzierenden Enden und der freien Glucose

Die Glucoseäquivalente wurden mit dem Nachweis reduzierende Enden nach Somogyi & Nelson bestimmt. Dieser Wert beinhaltet sowohl die reduzierenden Enden am Scleroglucan

als auch die an der freien Glucose. Die freie Glucose wird über die vorher vorgestellte GPC-Methode bestimmt. Diese Vorgehensweise erfolgt bei allen weiteren Hydrolysen.

Zum Startzeitpunkt der Hydrolyse  $t = 0$  liegen 0,64 mmol/L Glucoseäquivalente und 0,55 mmol/L freie Glucose vor. Die Differenz von 0,09 mmol/L drückt den Anteil der reduzierenden Enden am Scleroglucan aus. Die Glucoseäquivalente und die freie Glucose steigen bis 40 Minuten parallel zu einander an. Ab 40 Minuten vergrößert sich die Differenz der beiden Werte zusehens. Nach Versuchende  $t = 60$  beträgt die Differenz 0,22 mmol/L.

In Abbildung 3-13 ist das Elugramm der Proben zum Zeitpunkt  $t = 0$  und  $t = 60$  Minuten dargestellt, sowie die Molekulargewichtsverteilung des hochmolekularen (Abschnitt A) und niedermolekularen (Abschnitt B) Bereichs. Die größeren Moleküle eluieren vor den Kleineren. Bei der Molekulargewichtsverteilung erscheint diese Anordnung als Spiegelbild. Für die Ermittlung der Konzentration der Glucose wird das Integral unter dem Peak des Elugramms herangezogen. Die Molekulargewichtsverteilung eignet sich hier nicht, da  $W(\text{Log}((M)))$  eine statistische Verteilung darstellt und das umgerechnete Detektor Signal beinhaltet. In Abschnitt B ist mit II ein neuer Peak hervorgehoben, der im Molekulargewichtsbereich von Gentiobiose liegt. Der durch I gekennzeichnete Peak stellt durch seine Peakflächen Vergrößerung eine Zunahme dar. Zu diesem Zeitpunkt eluiert Glucose. Parallel dazu ist in dem links dargestellten Abschnitt A eine Abnahme der Peakfläche zu sehen. In diesem Bereich eluiert das hochmolekulare Scleroglucan.



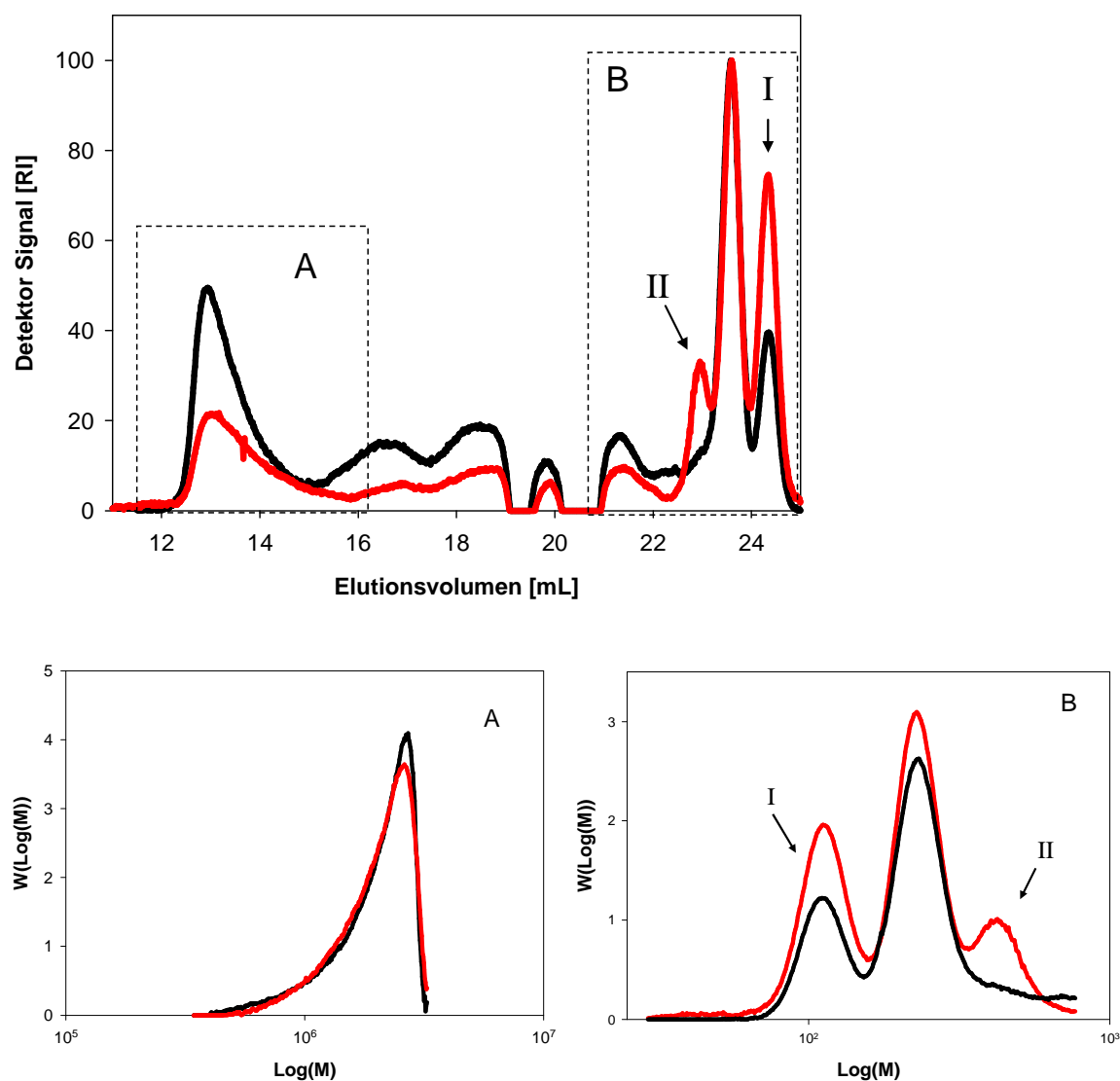


Abbildung 3-13: Spannungsverlauf am RI Detektor: Im oberen Graph ist das Elugramm von 11 – 25 mL dargestellt. Probe zum Zeitpunkt  $t = 0$  (schwarz) und nach  $t = 60$  (rot), herausgehoben ist die Molmassenverteilung  $W(\text{Log}(M))$ , Abschnitt A (linker unterer Graph) und Abschnitt B (rechter unterer Graph). In Abschnitt B weist II auf einen neu entstehenden Peak hin und I kennzeichnet die freie Glucose.

### Charakterisierung der Glucanaseaktivität

Wie an dem Beispiel mit Laminarinase beschrieben, wurden alle weiteren Enzyme und Enzymgemische untersucht. In der Tabelle 3-3 sind die Resultate der Hydrolysen zusammengefasst und ausgewertet.

Dabei wurde nach folgendem Schema vorgegangen: Zunächst wird die Differenz der reduzierenden Enden (rE) zwischen dem Endwert und dem Anfangswert bestimmt. Aus den Differenzen kann, auf die Enzymaktivität geschlossen werden.

$$rE_{\text{Ende}} - rE_{\text{Start}} = \Delta rE$$

$$\Delta rE = 0 \quad \rightarrow \text{keine Enzymaktivität}$$

$$\Delta rE > 0 \quad \rightarrow \text{Enzymaktivität}$$

Im nächsten Schritt erfolgt die Bestimmung der Glucose über die GPC, wobei nach dem gleichen Schema vorgegangen wird. Hier kann über Differenzbildung zwischen Endo- und Exoaktivität des Enzyms unterschieden werden. Mit  $\Delta rE > 0$  ergibt sich:

$$\text{Glucose}_{\text{Ende}} - \text{Glucose}_{\text{Start}} = \Delta \text{Glc},$$

$$\Delta \text{Glc} = 0 \quad \rightarrow \text{Enzym weist nur Endoaktivität auf,}$$

$$\Delta \text{Glc} > 0 \quad \rightarrow \text{Enzym weist Exo- und ggf. Endoaktivität auf.}$$

Der Vergleich von  $\Delta rE$  und  $\Delta \text{Glc}$  führt zur Unterscheidung von Endo- und Exoaktivität.

$$\Delta rE - \Delta \text{Glc} = 0 \quad \rightarrow \text{Exoenzymaktivität, mit } \Delta rE > 0 \text{ und } \Delta \text{Glc} > 0$$

$$\Delta rE - \Delta \text{Glc} > 0 \quad \rightarrow \text{Enzymgemisch Endo- und Exoaktivität mit } \Delta rE > 0$$

**Tabelle 3-3: Ergebnisse der Enzymcharakterisierung**

Enzym	$\Delta rE$ [mmol]	$\Delta \text{Glc}$ [mmol]	$\Delta rE - \Delta \text{Glc}$ [mmol]	Aktivität	
				Exo	Endo
AS 100	1,573	1,427	0,146	+	+
<i>B. subtilis</i>	0,095	0,094	0,001	+	-
BG	0,487	0,398	0,089	+	+
GH16	0	0		-	-
GH81	0	0		-	-
Laminarinase	0,513	0,380	0,133	+	+
NS	*	*		-	-
<i>P. funiculosum</i>	0,881	0,260	0,621	+	+
<i>T. harzianum</i>	2,186	1,780	0,406	+	+
<i>T. reesei</i>	1,945	1,248	0,697	+	+
TBG	1,673	1,610	0,063	+	+

\*nicht auswertbar auf Grund von Trübung

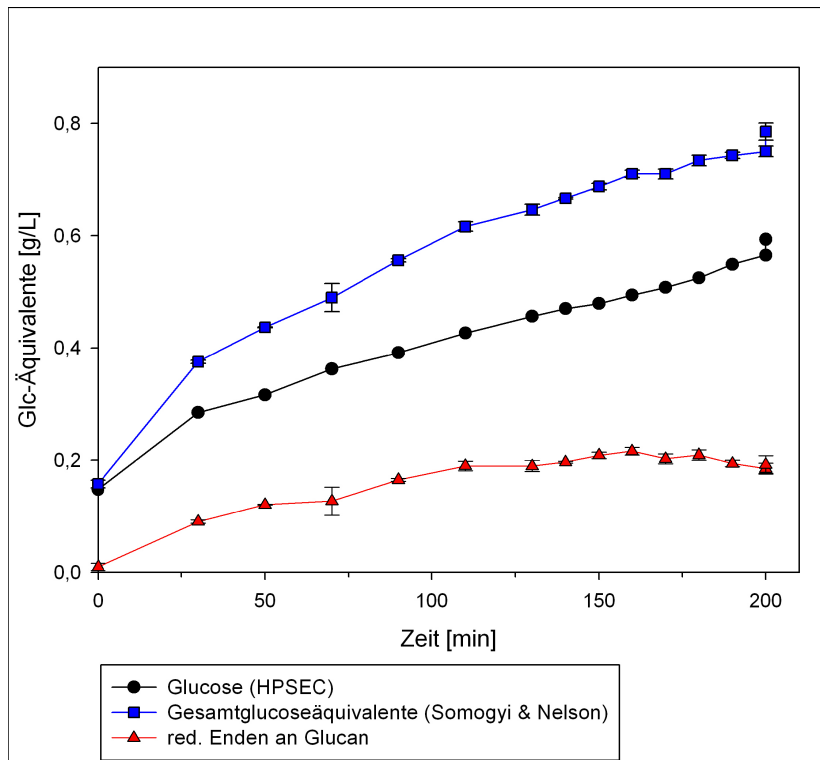
Für die Enzyme AS 100, BG und Laminarinase wurden jeweils sowohl Exo- als auch Endoaktivität gefunden. Dieses gilt auch für die Enzyme aus *P. funiculosus*, *T. harzianum* und *T. reesei*. Das Enzym aus *B. subtilis* weist reine Exoaktivität auf. TBG zeigt mit 0,063 mmol für die Differenz der reduzierenden Enden und der Glucose einen sehr geringen Wert, so, dass hier von einer sehr starken Exoglucanase-Aktivität ausgegangen werden kann. Bei den Enzymen GH16 und GH81 konnte keine Enzymaktivität am Scleroglucan festgestellt werden. Das Enzym NS konnte nicht ausgewertet werden, da es während der Reaktionszeit zu einer starken Trübung und der Bildung eines Präzipitats kam. Unter den getesteten Enzymen war keine reine Endoglucanase vorhanden. Auch konnte bei den Enzymgemischen, mit Ausnahme des Enzyms AS 100, keine Bildung von neuen Fraktionen in der GPC beobachtet werden. Daher wurde mit AS100 in einem größeren Maßstab eine Hydrolyse durchgeführt.

### 3.3.2. Enzymatische Hydrolyse mit AS 100

Die Hydrolyse in einem 50 L Bioreaktor wird im folgenden Text als Reaktorhydrolyse bezeichnet. Ziel war es eine ausreichende Menge Hydrolyseprodukt für z.B. Fütterungsversuche zu erhalten.

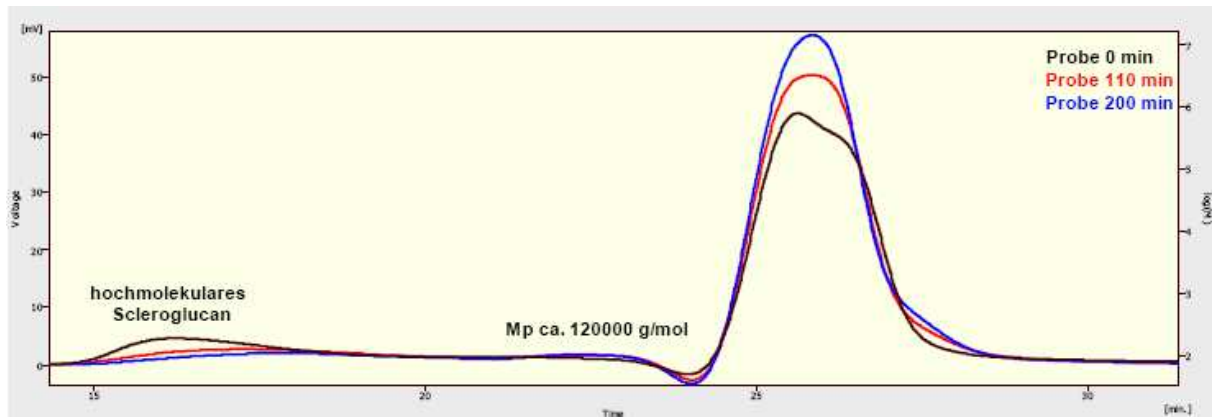
Der Glucosegehalt und die Gesamtglucoseäquivalente der eingesetzten Scleroglucanlösung besitzen am Anfang fast den gleichen Wert. Somit liegt der Wert für die reduzierenden Enden am Glucan anfänglich bei ungefähr Null. Dies ist durch die Aufarbeitung (Reinigung über Querstromfiltration, Cut-off 0,1 µm) zu erklären, da dabei auch kleinere Bruchstücke des Glucans aus der Lösung abgetrennt werden.

Die Reaktorhydrolyse wurde in einem 50 L Bioreaktor ausgerüstet mit zwei Schrägblattrührern, bei 50 °C und pH 6 über 200 Minuten durchgeführt. Die Konzentration des Glucans betrug 2 g/L bei einem Füllvolumen von 20 L. In Abbildung 3-14 ist der Verlauf der Kurven für die reduzierenden Enden und der freien Glucose dargestellt. Die Kurve für die freie Glucose zeigt eine gleichmäßige Freisetzung, wobei die Gesamtglucoseäquivalente nach 150 Minuten einen Plateauwert erreichen.



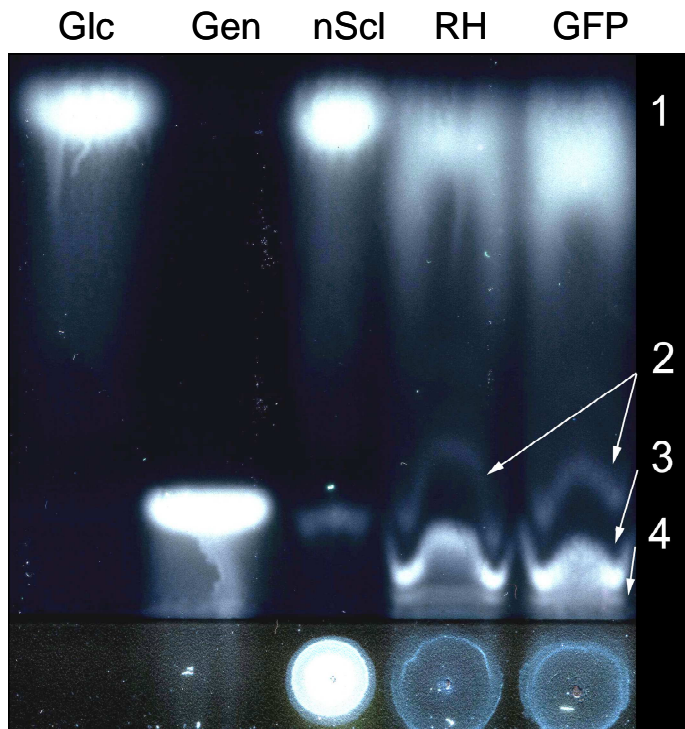
**Abbildung 3-14: Zeitlicher Verlauf der freien Glucose, der Gesamtglucoseäquivalente und der Differenz beider (entspricht red. Enden an Glucan in Glc-Äquivalenten [g/L]) für die Reaktorhydrolyse**

Wie schon Abbildung 3-14 zeigt auch Abbildung 3-15 die Freisetzung von Glucose durch die Erhöhung des entsprechenden Signals bei einer Retentionszeit von 26 Minuten. Der Glucan-Peak ist breit verteilt und umfasst eine Retentionszeit von 24 – 27 Minuten. Das Signal für das hochmolekulare Scleroglucan nimmt im Laufe der Hydrolyse signifikant ab. Das bedeutet, eine größere Menge an Glucan wurde hydrolysiert. Bei einer Retentionszeit von 23 Minuten ist ein sehr schwacher Peak zu erkennen. Diesen Peak kann ein Molekulargewicht von ungefähr 120.000 g/mol zugeordnet werden. Durch die Überlagerung des von Ameisensäure verursachten negativen Signals bei 23,5 Minuten ist der Peak möglicherweise gestört. Ob allerdings die reduzierenden Enden am Glucan, welche nachweislich gebildet wurden, allein an dieser sehr geringen Menge Scleroglucan zu finden sind, bleibt unklar.



**Abbildung 3-15:** HPSEC-Chromatogramm der Reaktorhydrolyse zur 0., 110. und 200. Minute mit einer Suprema 30.000 Säule (Auftrennungsbereich  $5.000$  bis  $30 \times 10^6$  g/mol; RI-Detektor)

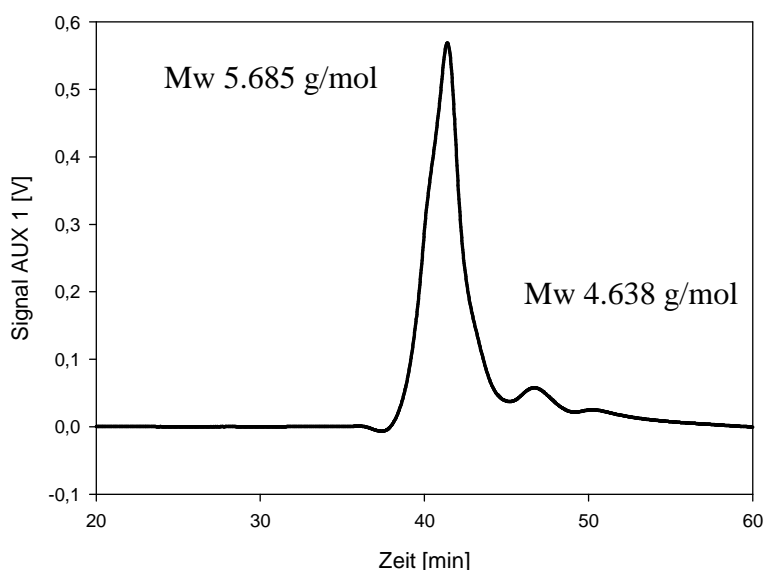
Das Produkt der Reaktorhydrolyse wurde durch Querstromfiltration aufkonzentriert. Eine weitere Charakterisierung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Eine Probe von nativem Scleroglucan (nScl), eine flüssige Filtratprobe der Reaktorhydrolyse (RH) und eine gefriergetrocknete Probe von RH (GFP) wurden miteinander verglichen und gegen Zuckerstandards aufgetragen. Die Proben RH und GFP unterscheiden sich nur wenig. Es sind vier Banden zu erkennen, wobei die Banden 2 und 4 sehr schwach sind. Sehr deutlich zu sehen ist die Glucosebande (Bande 1), welche in allen drei Proben auftaucht. Sie ist im nativen Glucan als Restglucose der Kultivierung enthalten und in den Proben RH und GFP zusätzlich bei der Reaktorhydrolyse entstanden. Durch die extrem hohe Salzkonzentration in diesen Proben erscheint die Glucose verschmiert. Auch die Banden 2 und 3 sind dadurch wellig. Bei der Bande 2 könnte es sich um Gentiobiose (Gen) handeln. Dieses Disaccharid besteht aus zwei Glucoseeinheiten, welche  $\beta$ -(1,6) verknüpft sind. Auch im nativen Glucan ist diese Bande schwach zu erkennen. Vermutlich ist sie durch teilweisen Abbau des Glucans durch  $\beta$ -Glucanasen während der Kultivierung oder Aufarbeitung entstanden. Bei Bande 3 handelt es sich vermutlich um ein Trisaccharid. Im nativen Glucan ist es nicht zu finden. Auch bei Bande 4 wird es sich um ein solches Bruchstück handeln, welches allerdings nicht genauer zugeordnet werden kann. Wahrscheinlich ist es ein Mehrfachzucker mit mehr als drei Untereinheiten.



**Abbildung 3-16:** Dünnschichtchromatographie vom nativen Scleroglucan (nScl), flüssiges Hydrolyseprodukt der Reaktorhydrolyse (RH) und gelöstem, gefriergetrocknetem Hydrolyseprodukt (GFP); (Standard 2,5 g/L Glucose (Glc); 3 g/L Gentiobiose (Gen); Bild in Farbumkehr. Die Zahlen kennzeichnen die Banden. 1 steht für Glucose, 2 Gentiobiose und Bande 3 und 4 mögliche Trisaccharide und/oder kleine Oligosaccharide.

Durch eine Querstromfiltration wurde das restliche hochmolekulare Glucan vom Hydrolyseansatz entfernt. Ein Teil des Filtrates wurde gefriergetrocknet. Dabei wurden aus 6 L Filtrat 47,6 g Feststoff gewonnen. Dieses enthält neben Scleroglucan-Fragmenten auch die Salze der Ameisensäure, Proteine aus den Enzymgemischen, Glucose und andere Zucker.

Die gefriergetrocknete Scleroglucan-Fraktion wurde durch Dialyse weiter aufgereinigt. Es wurde ein Dialyseschlauch mit einem cut off von 1.000 g/mol verwendet. Dialysiert wurde gegen 0,1 g/L  $\text{NaN}_3$ . Das dialysierte Produkt wurde erneut gefriergetrocknet. Diese gefriergetrocknete Fraktion wurde im Institut für Technische Chemie (TU Braunschweig) einer GPC mit einem angeschlossenen Lichtstreuendetektor vermessen.



**Abbildung 3-17:** GPC-Chromatogramm von gefriergetrockneten dialysiertem Filtrat der Reaktorhydrolyse (Detektor: Lichtstreudetektor; Säule: PL-aquagel-OH mixed; Auftrennungsbereich  $10^2$ - $10^6$  g/mol)

Die Abbildung 3-17 zeigt das Chromatogramm der dialysierten und gefriergetrockneten Fraktion der Reaktorhydrolyse. Es ist ein deutliches Signal bei einem Molekulargewicht von 5.685 g/mol zu erkennen. Ein wesentlich schwächeres Signal liegt bei 4.638 g/mol. Die in Abbildung 3-16 beschriebenen Mono- und Disaccharide wurden durch die Dialyse entfernt. Die Fraktion liegt für weitere Versuche entsalzen und von Mono- und Disacchariden befreit vor.

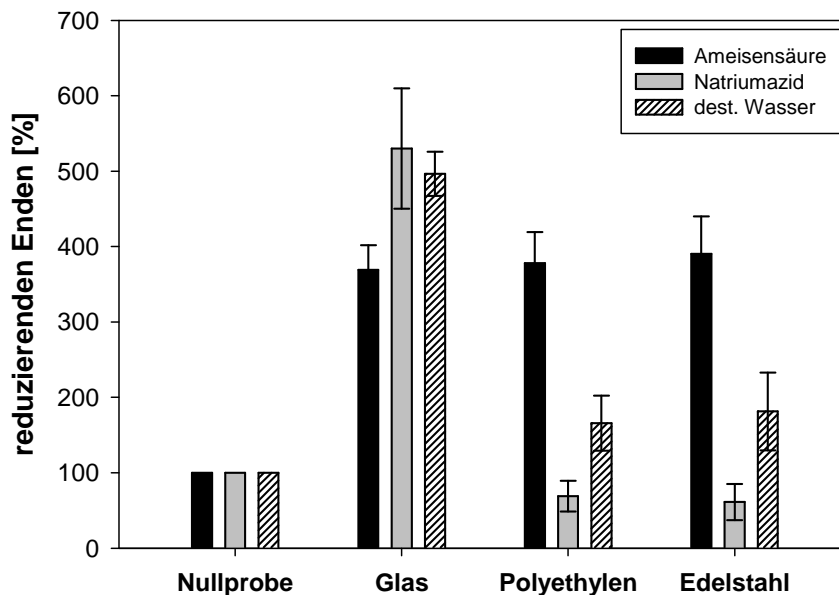
### 3.3.3. Thermische Oberflächenhydrolyse

Bei der thermischen Oberflächenhydrolyse des Scleroglucans wird der Einfluss von Bor-Silicat-Glas, Edelstahl und Kunststoff (PE) sowie des pH-Wertes untersucht. Dazu werden die in Kapitel 2.2.18 beschriebenen Ansätze 72 h bei 121 °C und 1 bar inkubiert. Anschließend werden die Einflüsse der unterschiedlichen Testparameter durch Messung der reduzierenden Enden, der Scherviskosität, der freien Glucose und des Molekulargewichts bestimmt.

Die drei untersuchten Ansätze hatten folgende Eigenschaften:

Ameisensäure	0,48 g/L Scleroglucan mit 5 g/L AS (pH 2,3; 1010 $\mu$ S)
Natriumazid	0,48 g/L Scleroglucan (180 $\mu$ S pH 3,0)
dH <sub>2</sub> O	0,48 g/L Scleroglucan (194 $\mu$ S pH 4,0)

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Ansätzen herstellen zu können, wurde die jeweilige Nullprobe auf 100 % gesetzt. In Abbildung 3-18 ist dieses zu sehen. Die Scleroglucanprobe, welche 5 g/L Ameisensäure enthält (schwarze Balken), zeigt unabhängig von den getesteten Oberflächen (Glas, Polyethylen (PE) und Edelstahl) eine Steigerung der reduzierenden Enden um  $> 300$  %. Aus diesen Daten kann kein oberflächenabhängiger Abbau festgestellt werden.



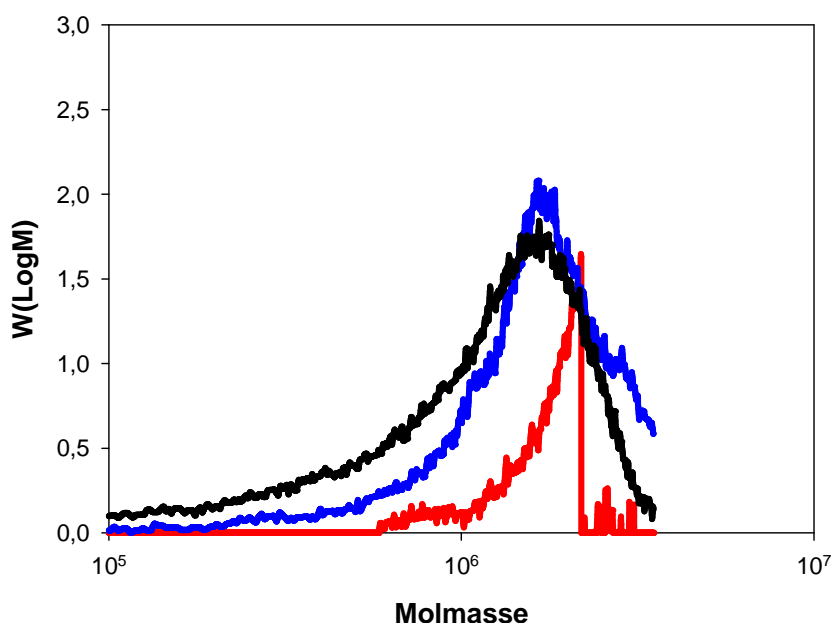
**Abbildung 3-18:** Reduzierende Enden am Scleroglucan (0,48 g/L) vor und nach der Inkubation bei 121 °C über 72 h; mit Ameisensäure behandeltes Scleroglucan (schwarz), dialysiert gegen 0,1 g/L  $\text{NaN}_3$  (hellgrau) und dialysiert gegen  $\text{dH}_2\text{O}$  (weiß schraffiert).

Bei den gegen Natriumazid und  $\text{dH}_2\text{O}$  dialysierten Proben zeigt sich ein unterschiedliches Ergebnis abhängig von der Oberfläche. Für beide Ansätze ist bei der Glasoberfläche eine Erhöhung um ca. 500 % zu sehen. Bei der PE- und Edelstahloberfläche zeigen jeweils beide ein ähnliches Verhalten. Die mit Natriumazid behandelten Ansätze (hell grau) zeigen eine Abnahme der reduzierenden Enden auf ca. 80 %. Die gegen  $\text{dH}_2\text{O}$  dialysierten Ansätze zeigen eine Erhöhung auf ca. 200 %.

Die Untersuchung der Molekulargewichte in der GPC zeigen, dass in den Scleroglucanansätzen, welche mit 5 g/L Ameisensäure stabilisiert wurden, kein hochmolekulares Scleroglucan mehr zu finden ist. Diese war unabhängig von der Oberfläche. Dieses trifft ebenso auf die Ansätze zu, welche gegen Natriumazid oder  $\text{dH}_2\text{O}$  dialysiert und in Glasgefäßen inkubiert wurden. Bei den in PE und Edelstahl inkubierten Ansätzen ist jedoch



eine Veränderung im hochmolekularen Molekulargewichtsbereich zu sehen. Es ist ein Abbau des hochmolekularen Scleroglucans festzustellen.



**Abbildung 3-19:** Molmassenverteilung des durch Oberflächenhydrolyse behandelten Scleroglucan (0,48 g/L), das gegen dH<sub>2</sub>O dialysiert wurde; Kontrolle ohne Behandlung (rot), PE (blau), Edelstahl (schwarz)

In der Abbildung 3-19 ist das 72 h autoklavierte Scleroglucan im Molmassenbereich von  $10^5$  bis  $10^7$  dargestellt. In der Tabelle 3-4 sind die Molekulargewichte des gegen dH<sub>2</sub>O und NaN<sub>3</sub> dialysierten Scleroglucans zu sehen. Dabei zeigt sich, dass bei den Ansätzen, welche gegen dH<sub>2</sub>O dialysiert wurden, ein stärkerer Abbau zu sehen ist. Bei dem in Edelstahl inkubierten Ansatz ist ein Abbau gegenüber der Kontrollprobe (dialysiert, keine Inkubation) um 55 %, bei der in Polyethylen um 19 % zu erkennen. Bei den gegen NaN<sub>3</sub> dialysierten Proben zeigt sich kein solch starker Abbau. Bei der Degradation in Bor-Silicat-Glas war kein Molekulargewicht mehr ermittelt worden.

**Tabelle 3-4:** Mw des Scleroglucans (0,48 g/L), durch Oberflächenhydrolyse degradiert

Dialysat	Kontrolle	Polyethylen	Edelstahl	Glas
NaN <sub>3</sub>	$2,89 \times 10^6$	$2,38 \times 10^6$	$2,47 \times 10^6$	x
dH <sub>2</sub> O	$3,04 \times 10^6$	$2,46 \times 10^6$	$1,34 \times 10^6$	x

X nicht bestimmbar

### **3.3.4. Aufreinigung der Hydrolyseprodukte**

Ein weiteres Problem bei der Produktion von Scleroglucan-Fractionen ist das Aufreinigen dieser Produkte. Die verwendeten Enzymgemische sollten aus den Fractionen entfernt werden, ebenso die entstandene Glucose.

Das Entfernen der Glucose kann durch Dialyse oder Querstromfiltration erfolgen. Dabei muss die geeignete Ausschlußgrenze beachtet werden. Das Eliminieren der Proteine wurde mit Hilfe von Bentonit und Hydroxyapatit getestet. Dabei wurde als Testgrundlage das Enzym AS100 verwendet.

Mit dem Hydroxyapatit ist es gelungen die Proteinkonzentration, bei einem Einsatz von 30 g/L Hydroxyapatit, um den Faktor 1,8 (130 mg/L auf 74 mg/L) zu reduzieren. Hydroxyapatitkonzentration von 2 g/L, 10 g/L ergaben keine nennenswerte Reduzierung.

Für Bentonit wurden sowohl für eine Konzentration von 11 g/L als auch für 2,2 g/L und für jegliche Verdünnungsstufen fast durchweg höhere Aufreinigungsfaktoren gefunden. Die höchste gemessene Proteinadsorption ergab sich für eine unverdünnte Probe bei einer Bentonitkonzentration von 11 g/L. Die Proteinkonzentration konnte dabei von 820 mg/L auf 330 mg/L gesenkt werden und verringerte sich damit um den Faktor 2,5. Für einen parallelen Ansatz von Scleroglucan ergab sich bei gleicher Bentonitkonzentration und ebenfalls unverdünnter Probe eine Reduktion der reduzierenden Enden von 0,16 g/L auf 0,13 g/L, was einem Verlust von etwa 19 % entspricht. Beim Überprüfen der Verringerung der Scleroglucan-Fractionen über die GPC-Methode zeigte sich, dass kein hochmolekulares Scleroglucan vorhanden war. Durch Bentonit kommt es sowohl zu einer Reduktion des Protein- als auch des Scleroglucangehaltes, letzteres wahrscheinlich durch Absorption.

### **3.3.5. Fluoreszenzmarkierung des Scleroglucans**

Für die (Kapitel 2.2.26) Fluoreszenzmarkierten Scleroglucane wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Diese ist in Abbildung 3-20 dargestellt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,24 µg/mL. Zwischen 0,24 – 7,8 µg/mL ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität.

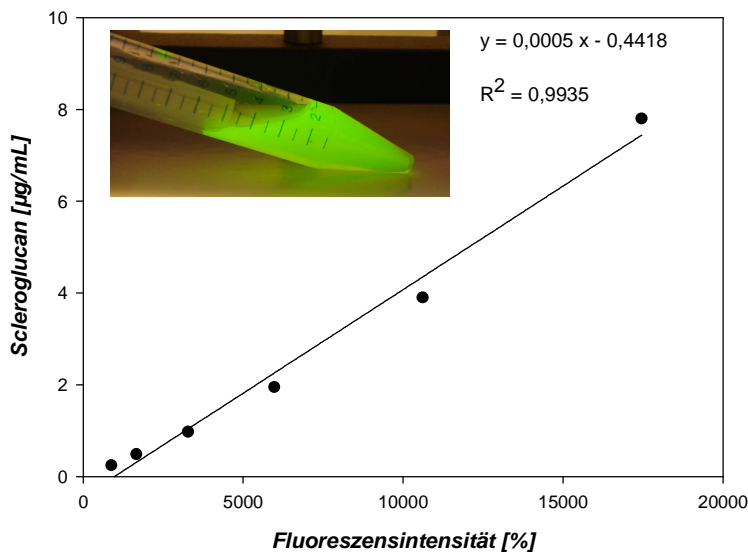


Abbildung 3-20: Mit 5-DTAF markiertes Scleroglucan (nachweisbar bis  $\geq 0,24 \mu\text{g/mL}$ )

### 3.4. Produktion einer Glucanase aus dem Schimmelpilz *Trichoderma harzianum* CECT 2413

Im Folgenden ist die Produktion einer Glucanase beschrieben. Die Produktion der Glucanase wurde nach zwei unterschiedlichen Verfahren vorgenommen; zum einen durch Kultivierungsbedingungen des Pilzes und zum anderen durch die Klonierung des Gens BGN13.1 in *Escherichia coli*. In der Literatur ist dieses Enzym als Endoglucanase beschrieben.

#### 3.4.1. Kultivierung von *T. harzianum*

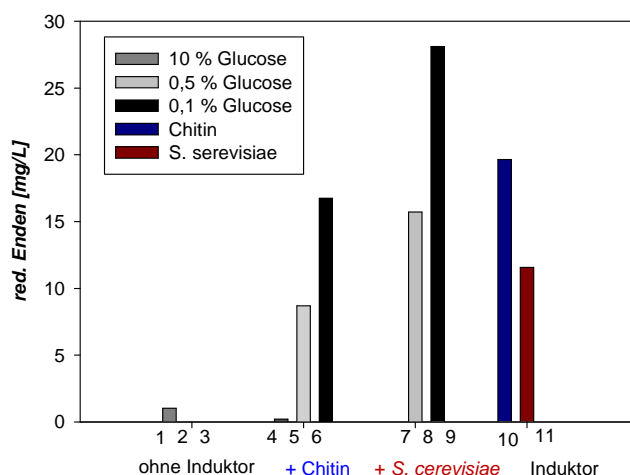
##### 3.4.1.1. Induktor

Bei der Kultivierung von *T. harzianum* erfolgt die Bildung einer Glucanase nur unter Induktion. Um dieses zu erreichen, wird eine Vorkultur in Schüttelkolben mit 2 Schikanen in M90-Medium herangezogen und die erhaltenen Zellen werden für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Zunächst wurden verschiedene Induktoren und Glucosekonzentrationen getestet. Alle Experimente hierzu wurden in einem 500 mL Kolben (2 Schikanen) mit 100 mL Medium und beimpft mit 10 mL Vorkultur durchgeführt. Die unterschiedlichen Ansätze sind in Tabelle 3-5 aufgezeigt. Die Kultivierung wurde nach 92 h durch Abtrennung der Zellen gestoppt.

**Tabelle 3-5: Ansätze für die Ermittlung des optimalen Induktionsmediums zur Produktion einer  $\beta$ -Glucanase mit unterschiedlichen Induktoren und Glucosekonzentrationen**

Ansatz	Induktor	Glucosekonzentration [%]
1	---	0,1
2	---	0,5
3	---	10
4	Chitin	0,1
5	Chitin	0,5
6	Chitin	10
7	<i>S. cerevisiae</i>	0,1
8	<i>S. cerevisiae</i>	0,5
9	<i>S. cerevisiae</i>	10
10	Chitin	---
11	<i>S. cerevisiae</i>	---

Für die Beurteilung, welches Medium am besten geeignet ist, wurde ein Aktivitätstest mit den Überständen der Ansätze durchgeführt. Als Substrat wurde hier eine Laminarin-Lösung verwendet. 1430  $\mu$ L der Laminarin-Lösung (0,1 g/L) wurden mit 570  $\mu$ L Kulturüberstand 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Ein Abstoppen der Reaktionen erfolgt bei 80 °C für 15 Minuten im Wasserbad. Ein weiterer Ansatz wurde jeweils sofort bei 80 °C abgestoppt um eine Nullprobe zu erhalten. Der Vergleich der Zunahme der reduzierenden Enden wird als Maß der relativen Aktivität herangezogen.



**Abbildung 3-21: Aktivitätstest der  $\beta$ -Glucanase an Laminarin mit unterschiedlichen Induktoren. (blau: Chitin; rot: *S. cerevisiae*)**

Eine Aktivität konnte ermittelt werden, wenn einer der beiden Induktoren vorhanden war und die Glucosekonzentration unterhalb der Repressionskonzentration (de la Cruz et al., 1995a) von 10 % lag. Die Aktivität (bezogen auf den Ansatz, nicht auf die BTM) steigt mit abnehmender Glucosekonzentration. Die größte Aktivität konnte bei Zugabe von 1 % *S. cerevisiae* und 0,1 % Glucose zu 28,12 mg/L freigesetzten reduzierenden Enden bestimmt werden. In Abbildung 3-22 sind die Kulturüberstände der unterschiedlichen Induktionsansätzen dargestellt.

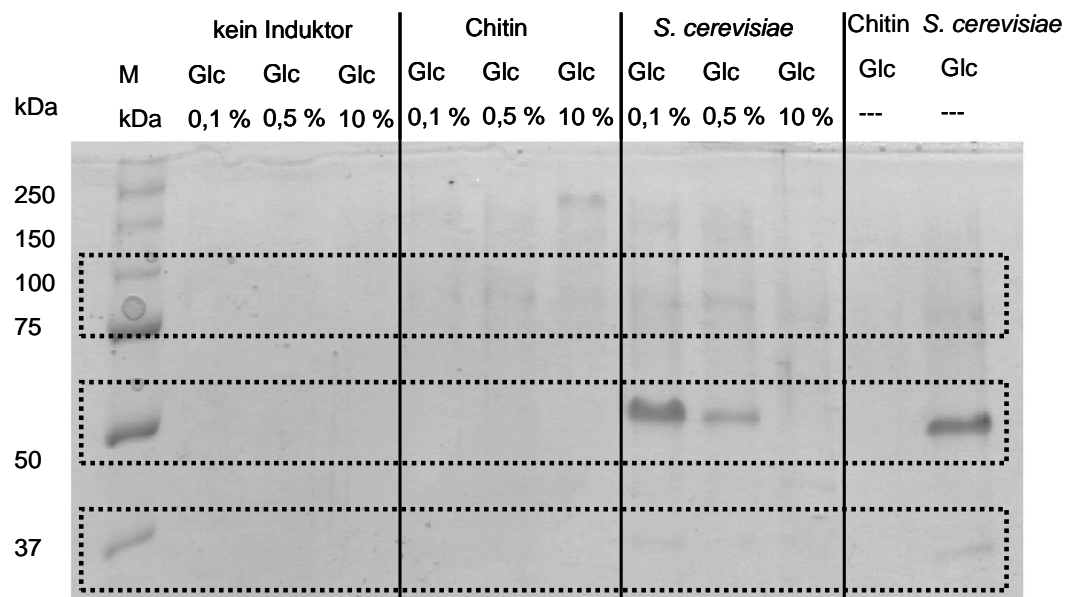


Abbildung 3-22: SDS-Page der Überstände aus den verschiedenen Induktionsansätzen (siehe Tabelle 3-5)

Eine Bande bei 75 kDa konnte bei Anwesenheit einer der beiden Induktoren und bei einer Glucosekonzentration  $\leq 0,5$  % festgestellt werden. Bei 10 % Glucose ist diese Bande, sofern überhaupt vorhanden, nur noch schwach erkennbar. Unter Verwendung von *S. cerevisiae* als induzierende Substanz konnte zusätzlich eine verhältnismäßig starke Bande um 50 kDa bestimmt werden. Bei sehr niedrigen Glucosekonzentrationen ( $\leq 0,1$  %) konnte eine weitere Bande um 37 kDa verzeichnet werden. Oberhalb von 100 kDa konnten weitere sehr schwache Banden beobachtet werden, sofern einer der beiden Induktoren vorhanden war. Keine der erwähnten Banden trat ohne Induktor auf. Mit Chitin und 0 % Glucose waren ebenfalls keine Banden ersichtlich.

Allen folgenden Optimierungen wurden daher mit 1 % *S. cerevisiae* und 0,1 % Glucose durchgeführt.

### 3.4.1.2. Zeitlicher Verlauf der $\beta$ -Glucanase Bildung

Es wurden drei 500 mL Kolben (2 Schikanen) mit Czapek-Medium und 0,1 % Glucose sowie 1 % *S. cerevisiae* mit *T. harzianum* aus einer Vorkultur angeimpft. Nach jeweils 24, 48 und 72 h wurden die Zellen separiert und der Überstand auf  $\beta$ -Glucanaseaktivität mit Scleroglucan als Substrat untersucht. Hier zeigte sich eine sehr geringe Aktivität nach 24 Stunden, nach 48 und 72 Stunden war eine wesentlich höhere Aktivität zu sehen. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Optimierungen mindestens 48 h kultiviert.

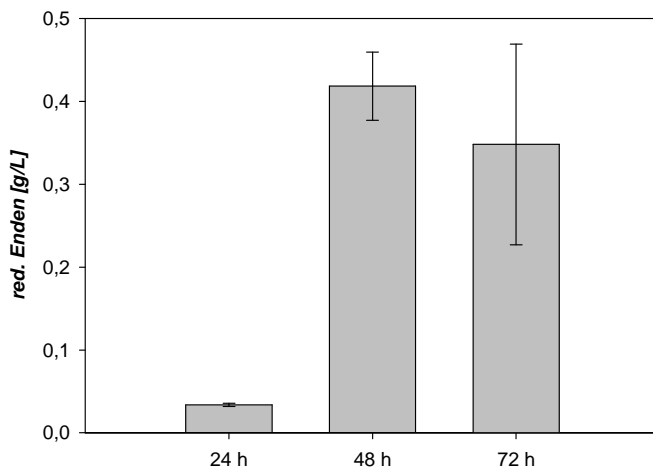


Abbildung 3-23: Zeitlicher Verlauf der  $\beta$ -Glucanaseaktivität (red. Enden) aus dem Überstand mit Scleroglucan (1 g/L) nach 24, 48 und 72 Stunden Induktion mit 1 % *S. cerevisiae* und 0,1 % Glucose.

### 3.4.1.3. Variation der Induktionsbedingungen

Es stellte sich die Frage, ob über Veränderungen der Induktionsbedingungen eine verstärkte Produktion von Glucanasen hervorgerufen werden kann. Aus diesem Grund wurden die in Tabelle 3-6 aufgeführten Ansätze getestet. In dieser Versuchsreihe wird das Edukt Scleroglucan zum Ansatz dazu gegeben, welches von den Glucanasen abgebaut werden soll. Es wurde von jedem Ansatz eine Probe nach 24, 48 und 72 h genommen und die Zellen vom Überstand getrennt. Mit dem Überstand wurde ein Aktivitätstest durchgeführt, bei dem die Zunahme der reduzierenden Enden gemessen wurde. Die hydrolysierten Proben wurden für die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der GPC-Methode vermessen. Zudem erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry und eine SDS-Page.

Tabelle 3-6: Ansätze für den Versuch einer Endoglucanase-Produktion

Ansatz	Glucose [%]	<i>S. cerevisiae</i> [%]	Scleroglucan nativ [%]
A	0,1	1	---
B	0,1	0,8	0,2
C	0,1	0,6	0,4
D	0,1	0,4	0,6
E	0,1	0,2	0,8
F	0,1	---	1
G	0,1	1	0,4
H	0,1	1	0,6

Nach Abbruch der jeweiligen Reaktion wurde die Proteinkonzentration nach Lowry und das Molekulargewicht mittels SDS-Page bestimmt (Abbildung 3-24). Auffällig ist eine Bande bei etwa 75 kDa, die in allen Ansätzen enthalten ist. In den Ansätzen A und B nimmt diese Bande mit steigender Inkubationszeit zu, wobei in allen anderen Ansätzen keine solche Tendenz erkennbar ist. Im Ansatz F, welcher als Induktor nur Scleroglucan enthält, ist ausschließlich die Bande bei 75 kDa und keine weitere zu beobachten. Auch die Bande bei 75 kDa ist im Vergleich zu den anderen Ansätzen mit *S. cerevisiae* schwächer ausgeprägt.

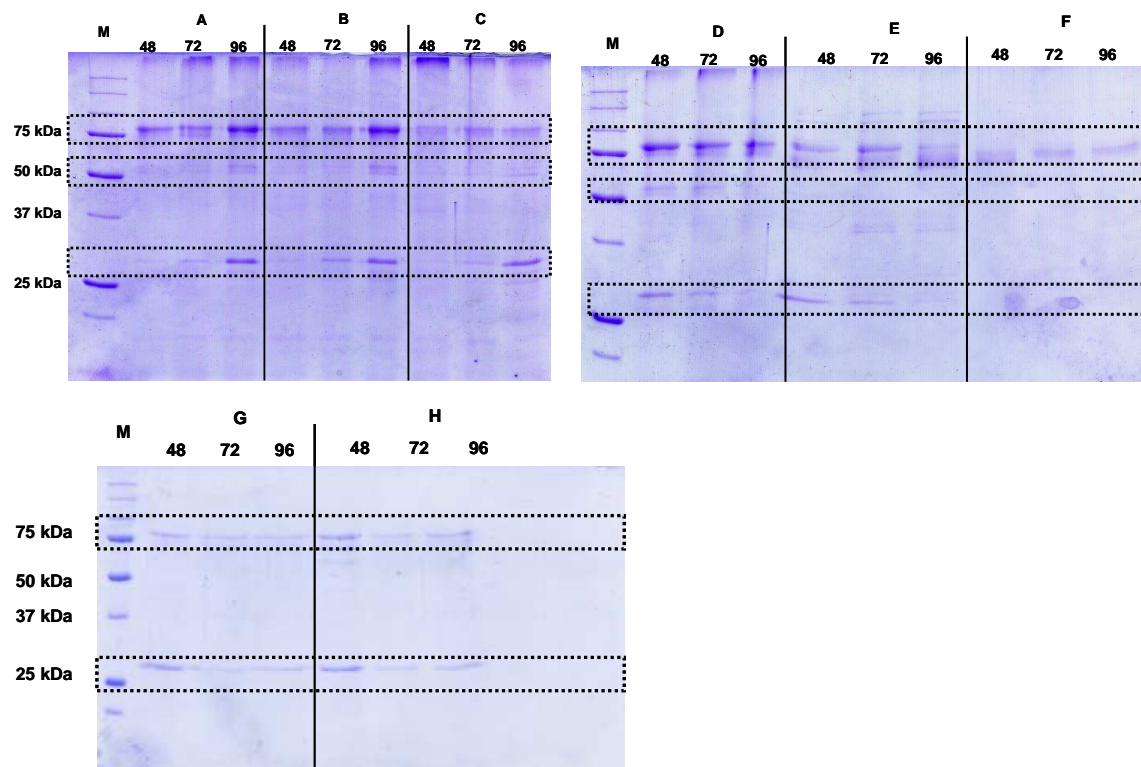
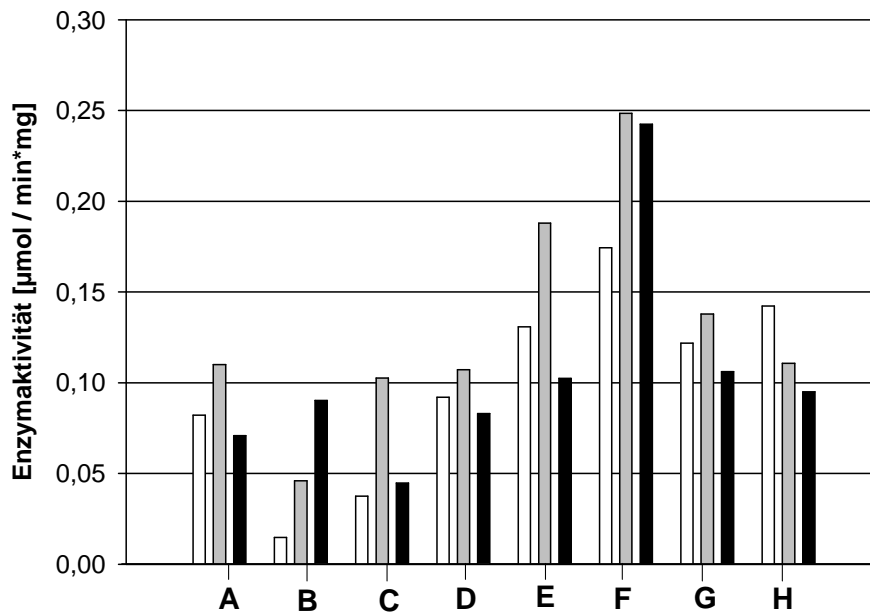


Abbildung 3-24: SDS-Page der unterschiedlichen Kultivierungsansätze A-H (Tabelle 3-6) nach 48, 72 und 96 h.

In den Ansätzen A, B, C und D ist zusätzlich eine Bande bei circa 50 kDa vorhanden. Diese Ansätze und der Ansatz E zeigen noch weitere Banden bei circa 30 kDa. Die Banden

bei 50 kDa sind sehr schwach ausgeprägt und es ist keine Tendenz in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer erkennbar. Bei 30 kDa ist in den Ansätzen A-C nach 96 h die höchste Konzentration zu erkennen. In den Ansätzen D-E und G-H ist ein umgekehrtes Verhalten zu beobachten. Eine klare Zuordnung eines Molekulargewichtes zur gesuchten  $\beta$ -Glucanase kann aber nicht gegeben werden. Aus diesem Grund wurde für die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität die gesamte Proteinkonzentration des Überstandes zugrunde gelegt.

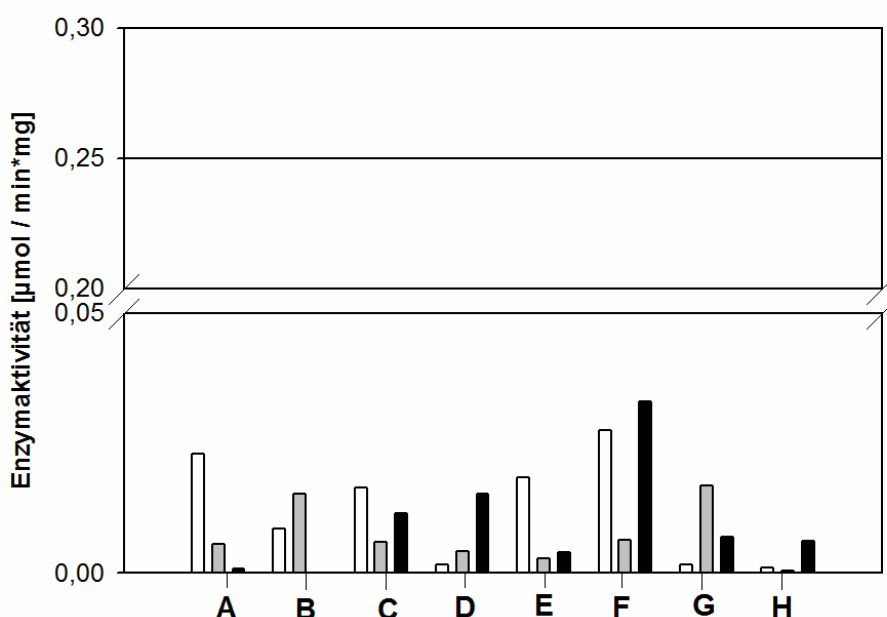


**Abbildung 3-25:** Spezifische Enzymaktivität nach 48 h (weiß), 72 h (grau) und 96 h (schwarz); A-H siehe Tabelle 3-6

In Abbildung 3-25 sind die spezifischen Enzymaktivitäten für alle Ansätze aufgeführt. Dabei ist die höchste Enzymaktivität in Ansatz F, der nur Scleroglucan als Induktor enthält, zu sehen. Nach 72 Stunden wird in allen Ansätzen, außer B und H, die höchste Enzymaktivität erreicht. Ansatz B nimmt in der Aktivität kontinuierlich zu, Ansatz H stetig ab. Mit Scleroglucan als Induktor ist die maximale Enzymaktivität von 0,25  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  nach 72 h erreicht.

Zur Charakterisierung der Glucanase wurde die Glucosebestimmung mittels GPC durchgeführt um zu überprüfen, ob es sich um Endo- oder Exoglucanaseaktivität handelt.





**Abbildung 3-26:** Spezifische Enzymaktivität bezogen auf die freigesetzte Glucose (GPC) nach 48 h (weiß), 72 h (grau) und 96 h (schwarz); A-H siehe Tabelle 3-6

In der Abbildung 3-26 ist die Enzymaktivität der Ansätze A-H dargestellt. Dabei wurde nur die Freisetzung reiner Glucose berücksichtigt und nicht wie Abbildung 3-25 der Gesamtwert der reduzierenden Enden, die sowohl die Glucose als auch die reduzierenden Enden am Scleroglucan umfasst. Von allen Ansätzen wurde zuvor der Anteil der freien Glucose zu Beginn der Reaktion abgezogen. Aus den unterschiedlichen Ansätzen ist keine eindeutige Tendenz in Abhängigkeit von den Induktoren und der Produktionszeit ersichtlich. Der Anteil der gebildeten Glucose geht von ca. 0,04  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  beim Ansatz F nach 48 und 96 Stunden bis auf 0,01  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  nach 72 Stunden zurück. Aufgrund einer fehlenden Tendenz wurde die Molekulargewichtsverteilung zur Beurteilung herangezogen. Beispielhaft werden die Daten anhand der 72 h Probe aus dem Ansatz F, der nur Scleroglucan als Induktor enthält, gezeigt. In der Abbildung 3-27 ist das gesamte Elugramm von 10 – 26 mL abgebildet. In blau ist das native, gegen 0,1 g/L  $\text{NaN}_3$  dialysierte Scleroglucan, welches für die Hydrolyse als Substrat verwendet wurde, in schwarz der reine Kulturüberstand und in rot das hydrolysierte Scleroglucan dargestellt.

Bei etwa 20 mL ist ein Peak zu beobachten, der in allen drei Proben vorhanden ist und sich nicht verändert. Hervorgehoben ist im Abschnitt A der Abbildung das Elutionsvolumen von 11 – 19 mL. Hier ist die Peakflächenverkleinerung des nativen Scleroglucans deutlich zu sehen. Zwischen 12 und 14 mL verschwindet der Scleroglucanpeak fast vollständig. Hier ist auch sehr deutlich zu erkennen, dass die mit I und II gekennzeichneten Peaks auf den

Kulturüberstand zurück zu führen sind. Hier ist zwar eine leichte Peakverschiebung ersichtlich die allerdings nicht durch die Hydrolyse entstanden ist. Der mit III gekennzeichnete Peak ist bereits schon im Kulturüberstand vorhanden, es ist aber zusätzlich eine deutliche Zunahme zu erkennen.

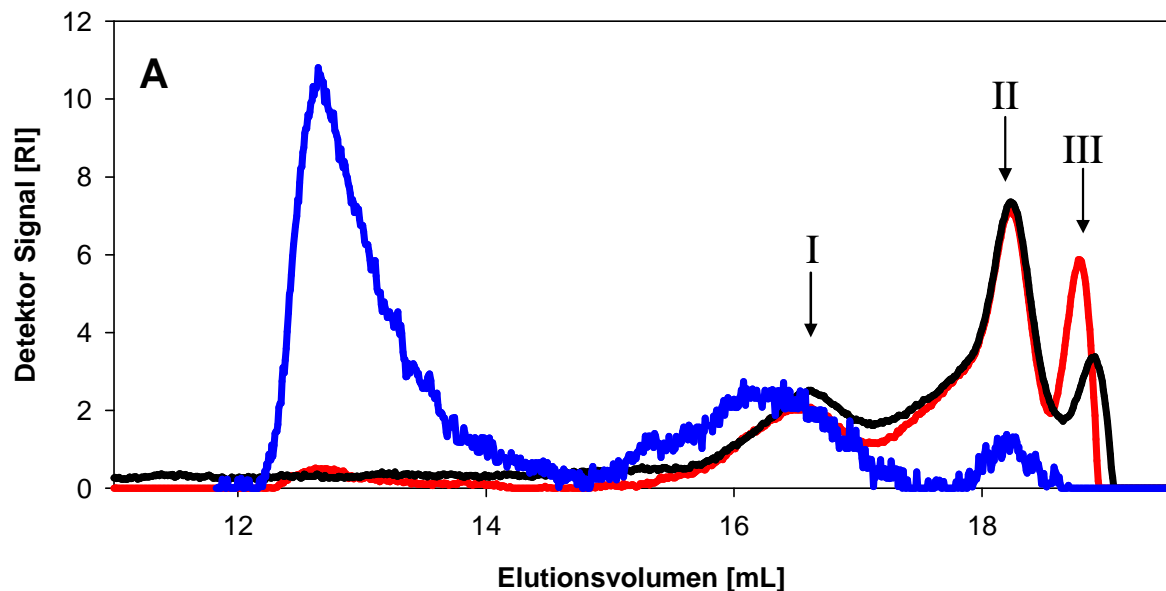
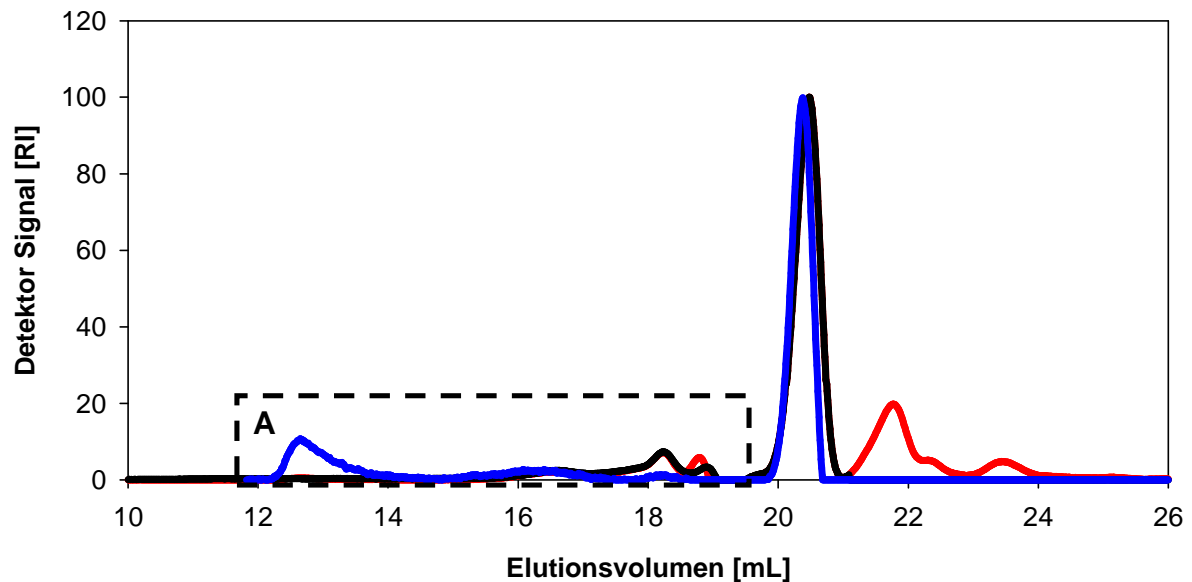


Abbildung 3-27: Elugramm der Hydrolyse F (Tabelle 3-6): Reiner Kulturüberstand von *Trichoderma harzianum* (rot), Scleroglucan mit Kulturüberstand nach 1h Hydrolyse (schwarz) und natives dialysiertes Scleroglucan (blau); I: Peak bei ca. 16,5 mL, II: Peak bei 18 mL, III: Peak bei 19 mL;

### 3.4.2. Rekombinante Produktion in *E. coli*

Um die rekombinante Produktion in *E. coli* umsetzen zu können, muss die mRNA aus *T. harzianum* (CECT 2413) gewonnen, anschließend in cDNA transkribiert und in *E. coli* kloniert werden.

#### 3.4.2.1. Isolierung der mRNA

Der Stamm *T. harzianum* wurde in 200 mL MPG-Medium kultiviert. Zur Induktion von BGN13.1 wurden 200 mL Czapek-Medium mit 0,1 % Glucose, 1 % *S. cerevisiae* und pH 5,0 (500 mL Schüttelkolben, 2 Schikanen) mit 10 mL dieser MPG-Kultur angeimpft. Nach 3 Tagen wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA in zwei parallelen Ansätzen isoliert. Aus einem Ansatz wurde die mRNA isoliert, die Konzentration betrug 754,0 ng/μL.

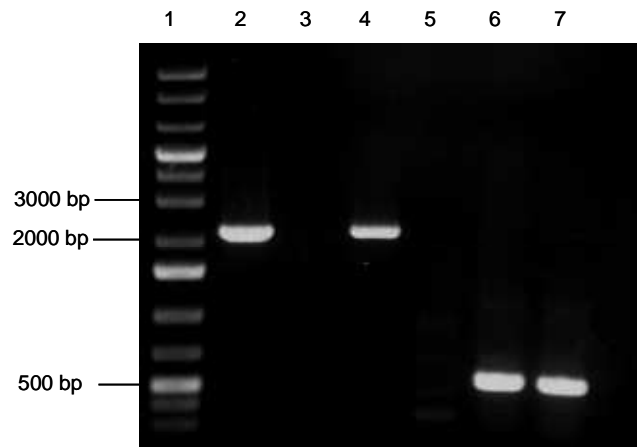
Ausgehend von der Gesamt-RNA und von der mRNA wurde je eine cDNA mit Oligo-(dT)<sub>20</sub>- und Random-Hexamer-Primern synthetisiert. Zur Übersicht sind die cDNAs in der Tabelle 3-7 aufgeführt:

**Tabelle 3-7: Übersicht der aus CECT 2413 gewonnenen cDNA**

Synonyme	RNA	Konzentration [ng/μL]	mRNA- Isolation	Primer
cDNA-2413-A	1	761,3	nein	Oligo-(dT) <sub>20</sub>
cDNA-2413-B	2	754	ja	Oligo-(dT) <sub>20</sub>
cDNA-2413-C	1	761,3	nein	Random-Hexamer
cDNA-2413-D	2	754	ja	Random-Hexamer

Mit den verwendeten Primern soll ein Fragment mit einer Größe von 2187 Basenpaaren (Bp) amplifiziert werden.

Neben der eigentlichen Amplifikation wurden die cDNA-2413-A und cDNA-2413-C mit dem Actin-Primerpaar ActinFor und ActinRev überprüft. Bei einer erfolgreichen cDNA-Synthese sollte unabhängig von den Kultivierungsbedingungen das „Housekeeping Gene“ Actin nachzuweisen sein. Das resultierende Fragment sollte eine Größe von 509 Bp haben.

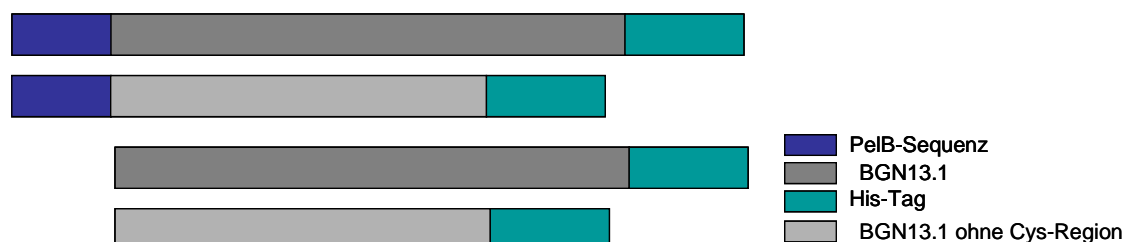


**Abbildung 3-28:** PCR mit f3 und r3 der cDNA-2413-A bis D; 1 Marker, 2 bis 4 PCR-Produkte der Templates A bis D mit dem Primerpaar 3; Spur 6 und 7 PCR-Produkt der Templates A und C mit Primer ActinFor und ActinRev

Wie aus Abbildung 3-28 hervorgeht, konnte das gesuchte Fragment aus dem Stamm CECT 2413 isoliert werden. Sowohl das Template auf Basis der Oligo-(dT)<sub>20</sub> - als auch auf Basis der Random-Hexamer-Primer erbrachte das gewünschte Ergebnis (Bande bei ca. 2200 Bp). Die PCRs mit cDNA-2413-B und D erbrachten kein positives Ergebnis. Die Kontroll-PCR mit den Actin-Primern war ebenfalls erfolgreich und zeigte die zu erwartenden Banden bei ca. 500 bp.

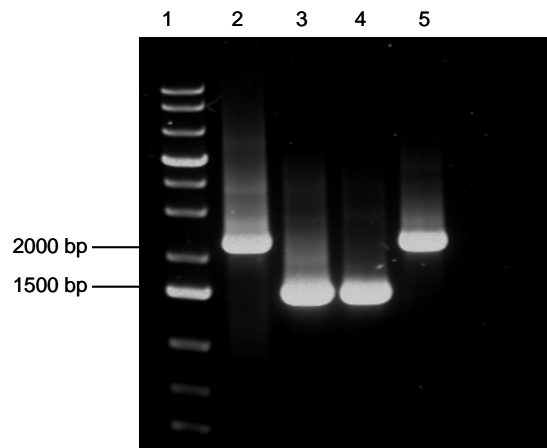
### 3.4.2.2. Klonierung in *E. coli*

Mit den PCR-Produkten cDNA-2413-A und C wurde eine weitere PCR mit den Primern BGN\_NheI\_f und BGN\_short\_NotI\_r oder BGN\_with Cys\_NotI durchgeführt, um Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in dem Vektor pET-21a(+) vorzubereiten. Die Ergebnisse der PCR sind in Abbildung 3-30 zu finden. Das Plasmid und die PCR-Produkte wurden mit den passenden Restriktionsenzymen (NotI und NheI) geschnitten und das PCR-Produkt in das Plasmid ligiert. In der Abbildung 3-29 sind schematisch die Klonierungsansätze des BGN13.1 dargestellt.



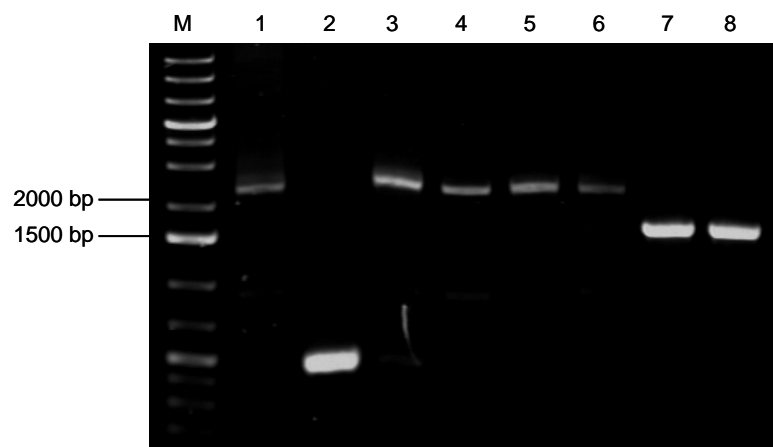
**Abbildung 3-29:** Schema des BGN13.1 und der Klonierungsansätze

Von dem Gen BGN13.1 wurde in einem Ansatz die cysteinreiche Region entfernt, die für den Kontakt an die Zellwand verantwortlich sein soll. Der His-Tag und die PelB-Sequenz wurden über den Vektor in das Produkt eingebracht. Der His-Tag ist für spätere mögliche Aufreinigungsschritte wichtig. Die PelB-Sequenz dient zum Ausschleusen des Produktes aus der *E.coli* Zelle.



**Abbildung 3-30: PCR für Restriktionsschnittstellen:** 1= Marker; 2 = Template A mit Cystein-reicher-Region; 3 = Template A ohne Cystein-reicher-Region; 4 = Template C ohne Cystein-reicher-Region; und 5 = Template C mit Cystein-reicher-Region;

Die so erhaltenen Vektoren wurden mittels Heatschock-Methode in *E. coli* XL1blue transformiert. Von den so erhaltenen Klonen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, die keinen Erfolg zeigte. Deshalb wurde von ausgewählten Klonen das Plasmid isoliert und mit ihnen erneut eine Kolonie-PCR durchgeführt.



**Abbildung 3-31: Kolonie-PCR** M = Marker, Bande 1, 3, 4, 5 und 6 zeigten positive Klone mit dem gesamten BGN13.1; Bande 7 und 8 zeigten BGN13.1 ohne Cystein-reiche-Region; Bande 2 zeigt Klon ohne BGN13.1

Die Ergebnisse der Kolonie-PCR sind in Abbildung 3-31 zu sehen. Nur bei einem Klon erfolgte keine Ligation des PCR-Produktes, dieses ist in Spur 2 zu sehen. Aus den positiven Klonen wurden A5 (Bande 3) und C<sub>5</sub>3 (Bande 7) für die weitere Produktion der Glucanase ausgewählt und eine Sequenzierung durchgeführt.

### 3.4.2.3. Produktion des PCR-Produktes

Für die Produktion des BGN13.1 wurde das Plasmid in den *E. coli* Stamm BLR(DE3) transformiert. Die Produktion wurde in 2 x YT-Medium mit 1% Glucose mittels Induktion durch IPTG durchgeführt.

In der Tabelle 3-8 sind die durchgeführten Ansätze zur Produktion eines löslichen Produktes aufgeführt. In der Abbildung 3-32 ist beispielhaft das Ergebnis eines Expressionsversuches dargestellt.

**Tabelle 3-8: Ansätze zur Produktion eines löslichen Bgn13.1**

<b>IPTG</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Produktionszeit [h]</b>	<b>Inclusion bodies</b>
10 µM	25; 30	4	✓
	17	24	✓
50 µM	25; 30	4	✓
	35	3	✓
	17	24	✓
1 mM	25; 30	4	✓
	35	3	✓

Das Expressionsergebnis der Produktion bei 30 °C und 50 µM IPTG zeigt eindeutig im Zellpellet nach der Lysierung (PP) eine Bande bei 75 kDa nach 2 und 4 Stunden Induktion durch IPTG. Nach der Lysierung des Pellets ist jedoch kein lösliches Protein im Überstand (ÜP) zu erkennen sowie kein Produkt im Kulturüberstand (Ü).

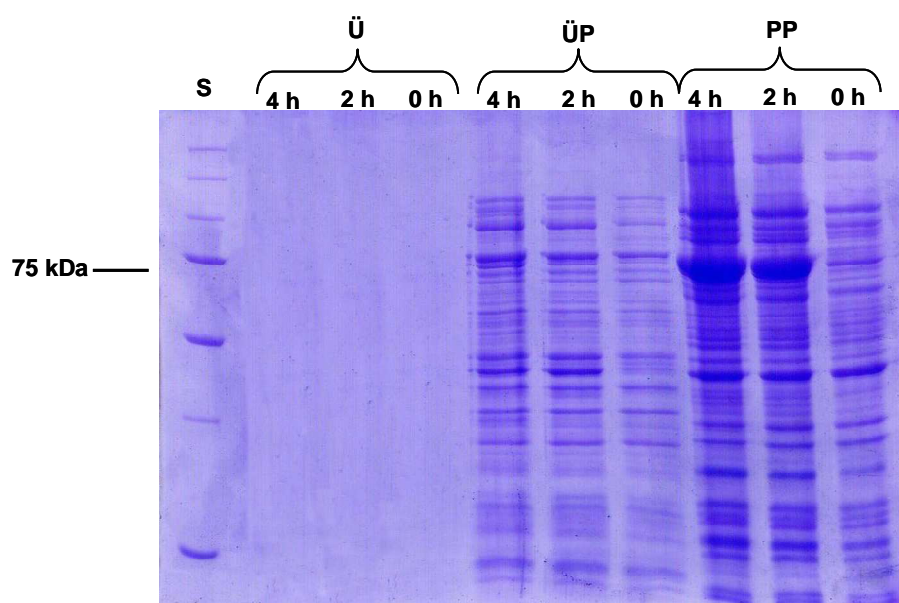


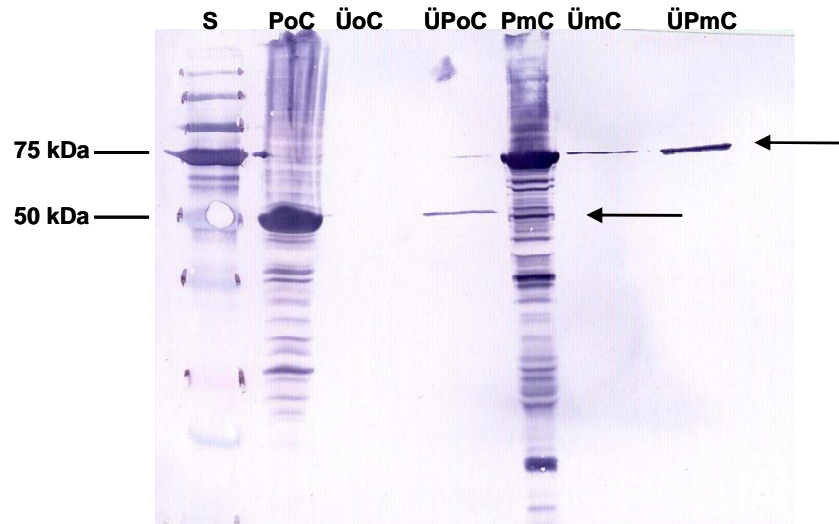
Abbildung 3-32: SDS-PAGE der Expression bei 30 °C. S = Proteingrößenstandard, Ü = Überstand aus der Kultivierung, PP = Pellet nach der Lysierung des Zellpellets und ÜP = Überstand nach der Lysierung des Zellpellets nach der Kultivierung;

Da die Versuche mit dem beschriebenen Vektor nicht erfolgreich waren, wurde mit dem PCR-Produkt A und C eine erneute PCR durchgeführt. Mit den folgenden Primern wurde das Klonieren in einen Vektor mit einer pel-B Sequenz ermöglicht. Durch diese Sequenz soll das PCR-Produkt aus der Zelle geschleust und so die Möglichkeit für ein lösliches Produkt erhöht werden. Diese wurde, wie schon für den Vektor pET-21a(+) beschrieben, durchgeführt. Folgende Kultivierungsansätze wurden getestet:

Tabelle 3-9: Ansätze für die Produktion im Vektor pET-21a(+) pel-B

IPTG	Temperatur [°C]	Produktionszeit [h]	Inclusion bodies
1 mM	17	24	-
	25	4	✓

Bei 25 °C zeigte sich auch bei diesem Vektor kein lösliches PCR-Produkt, wobei nach 24 Stunden Produktion bei 17 °C im SDS-Gel eine schwache Bande sichtbar wurde. Aus diesem Grund wurde mit diesem Ansatz ein Nachweis der PCR-Produkte mittels Western-Blot durchgeführt. Die Anfärbung erfolgt über den an das PCR-Produkt gekoppelten His-Tags. In der Abbildung 3-33 ist das Ergebnis des Western Blots zu sehen. Es ist sowohl im Zellpellet (P) als auch im Kulturüberstand (Ü) und im Überstand des lysierten Pellets (ÜP) ein lösliches Produkt zu sehen.



**Abbildung 3-33:** Western-Blot der Produktion von BGN13.1 bei 17 °C über 24 h mit 1 mM IPTG; S = Proteinstandard; PoC = Pellet der Produkt ohne Cystein, ÜoC = Überstand der Produktion ohne Cystein, ÜPoC = Überstand nach der Pelletlysierung der Produktion ohne Cystein, PmC = Pellet des gesamten Proteins bgn13.1, ÜmC = Überstand des gesamten Proteins bgn13.1 und ÜPmC = Überstand des lysierten Pellets des gesamten Proteins bgn13.1;

Zur Aufkonzentrierung des produzierten Proteins wurde das Zellpellet lysiert, der lösliche Überstand des Pellets und der Überstand auf Enzymaktivität getestet. Der Überstand wurde vorher durch Ammoniumsulfat-Fällung und anschließende Dialyse gegen eine phosphatgepufferte Salzlösung aufkonzentriert.

Die Enzymaktivität wurde gegen Scleroglucan getestet, es konnte allerdings keine Aktivität festgestellt werden.

### 3.5. Versuche am Modellorganismus Schwein

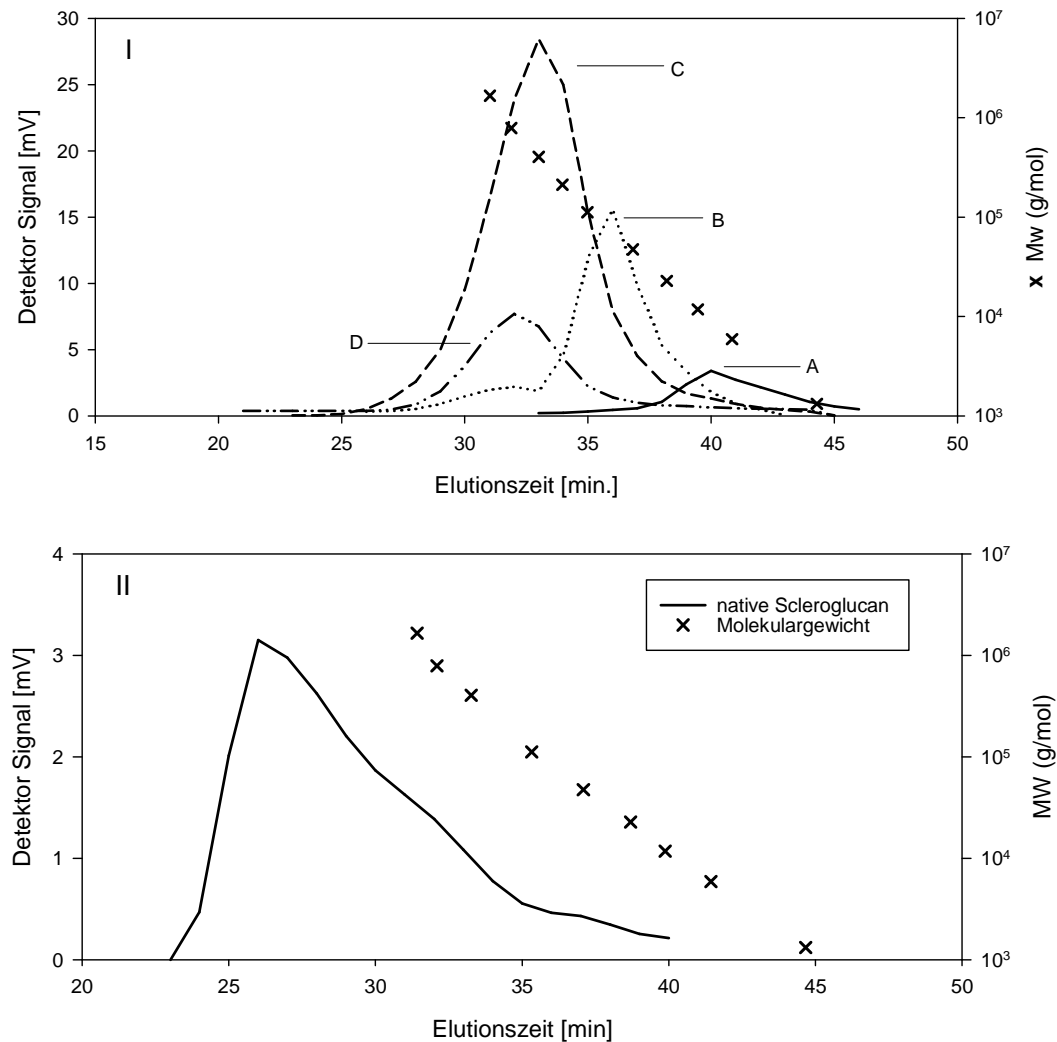
#### 3.5.1. Zytokin-Spiegel bei der Aktivierung von Dendritischen Zellen durch Scleroglucan

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. habil. Hermann-Josef Rothkötter und Frau Dr. Diane Bimczok (Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) wurden die folgenden Versuche durchgeführt und veröffentlicht (Bimczok et al., 2009).



### 3.5.1.1. Molekulargewichtsabhängigkeit

Um den Einfluss des Molekulargewichtes auf das Immunsystem zu testen, wurden dendritische Zellen des Schweines mit Scleroglucanhydrolysaten versetzt. Die molekulare Charakterisierung der verschiedenen Hydrolysate A-D sind in Abbildung 3-34 dargestellt.



**Abbildung 3-34: Chromatogram der Scleroglucan-Hydrolysate (I Fraktion A-D) und des nativen Polymers (II), x = Pullulanstandards**

Die Molekulargewichte aller Fraktionen überschneiden sich. Fraktion A enthält niedermolekulare Oligomere, deren oberer Molekulargewichtsbereich zu etwa 15 % (w / w) bzw. 2 % (w / w) Fraktionen B und C überdeckt. In der Tabelle 3-10 sind die aus den GPC-Daten resultierenden Molekulargewichte zusammengefasst.

Tabelle 3-10: Molekulargewichte der Fraktionen A-D und des nativen Scleroglucans

Name	Molekular- gewichtsfraction [g mol <sup>-1</sup> ]	Mittleres Molekulargewicht M <sub>w</sub> [g/mol]	Mittleres Zahlenmittel M <sub>n</sub> [g/mol]	Polydispersität M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
A	< 5.000	10.016	7.507	1,33
B	5.000 – 10.000	20.289	12.742	1,59
C	10.000-100.000	446.633	108.743	4,11
D	>100.000	569.455	154.338	3,68
SC	Natives Scleroglucan	4.978.934	2.041.193	2,43

Die IL-6 und TNF $\alpha$  Sekretion durch gereifte MoDZs wurde mittels Sandwich ELISA überprüft. Die DZs wurden mit  $\beta$ -Glucanen unterschiedlichen Molekulargewichts versetzt, nach 6, 24 und 48 Stunden wurde der Überstand entnommen und der Zytokingehalt bestimmt. In Abbildung 3-35 sind die Ergebnisse dargestellt. Die  $\beta$ -Glucan Fraction A (< 5 kDa) mit dem geringsten Molekulargewicht stimulierte nur die Bildung von TNF $\alpha$ . Die Freisetzung von IL-6 wurde durch Fraktion A nicht beeinflusst. Die anderen Molekulargewichtsfractionen (B-D), sowie das native  $\beta$ -Glucan, zeigten nur geringe Effekte auf die untersuchten Zytokine. Die Molekulargewichtsfractionen wurden alle mit einer Konzentration von 100  $\mu$ g/mL eingesetzt. Eine weitere Fragestellung war in wie weit die Konzentration des Polymers einen Einfluss auf die Bildung von Zytokinen hat.

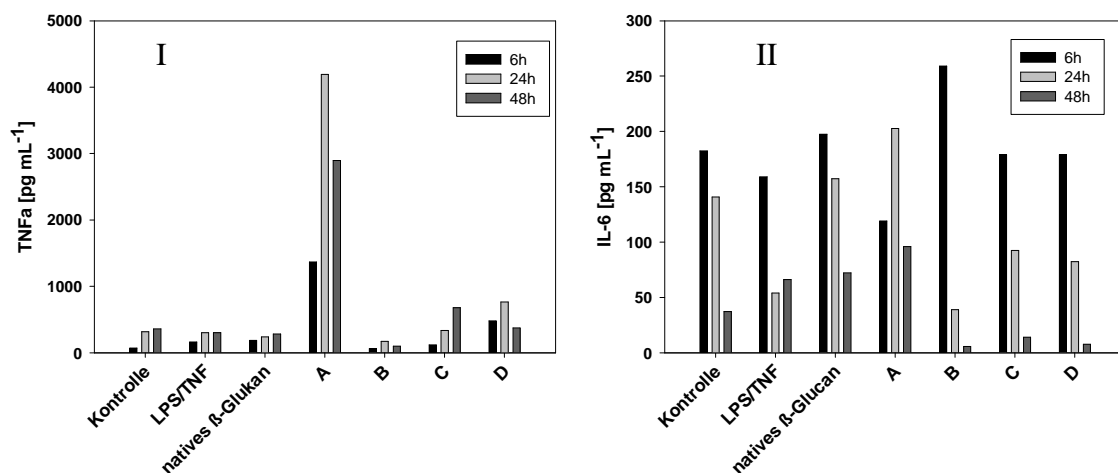


Abbildung 3-35: Einfluss verschiedener Molekulargewichtsfractionen von Scleroglucan auf die Freisetzung von TNF $\alpha$  (I) und IL-6 (II) aus gereiften DZs; A (< 5.000 g/mol), B (5.000 – 10.000 g/mol), C (10.000 – 100.000 g/mol), D (> 100.000 g/mol)

### 3.5.1.2. Konzentrationsabhängigkeit

Abbildung 3-36 zeigt die Ergebnisse der Konzentrationsabhängigkeit. Bezogen auf die Kontrolle (480 pg/mL) und Kontroll-Stimulation (750 pg/mL) mit LPS/TNF $\alpha$  wurden nach 24 h Inkubation mit 0,1  $\mu$ g/mL nativen  $\beta$ -Glucan erhebliche Mengen an IL-6 (950 pg/mL) und TNF $\alpha$  (6 pg/mL) in den Überstand abgegeben. Konzentrationen von  $\beta$ -Glucan > 0,1  $\mu$ g/mL ergeben einen gegensätzlichen Effekt und reduzierten die Zytokin Ausscheidung.

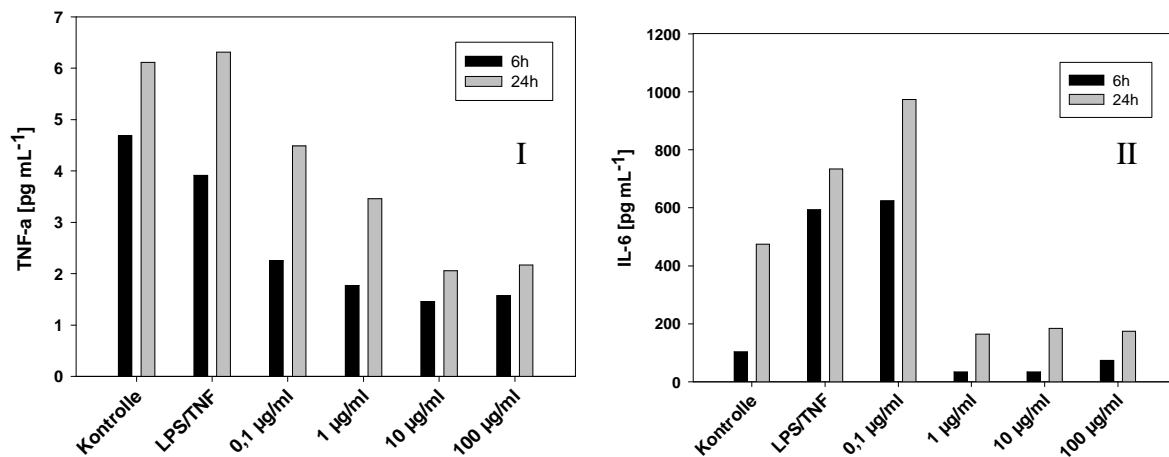
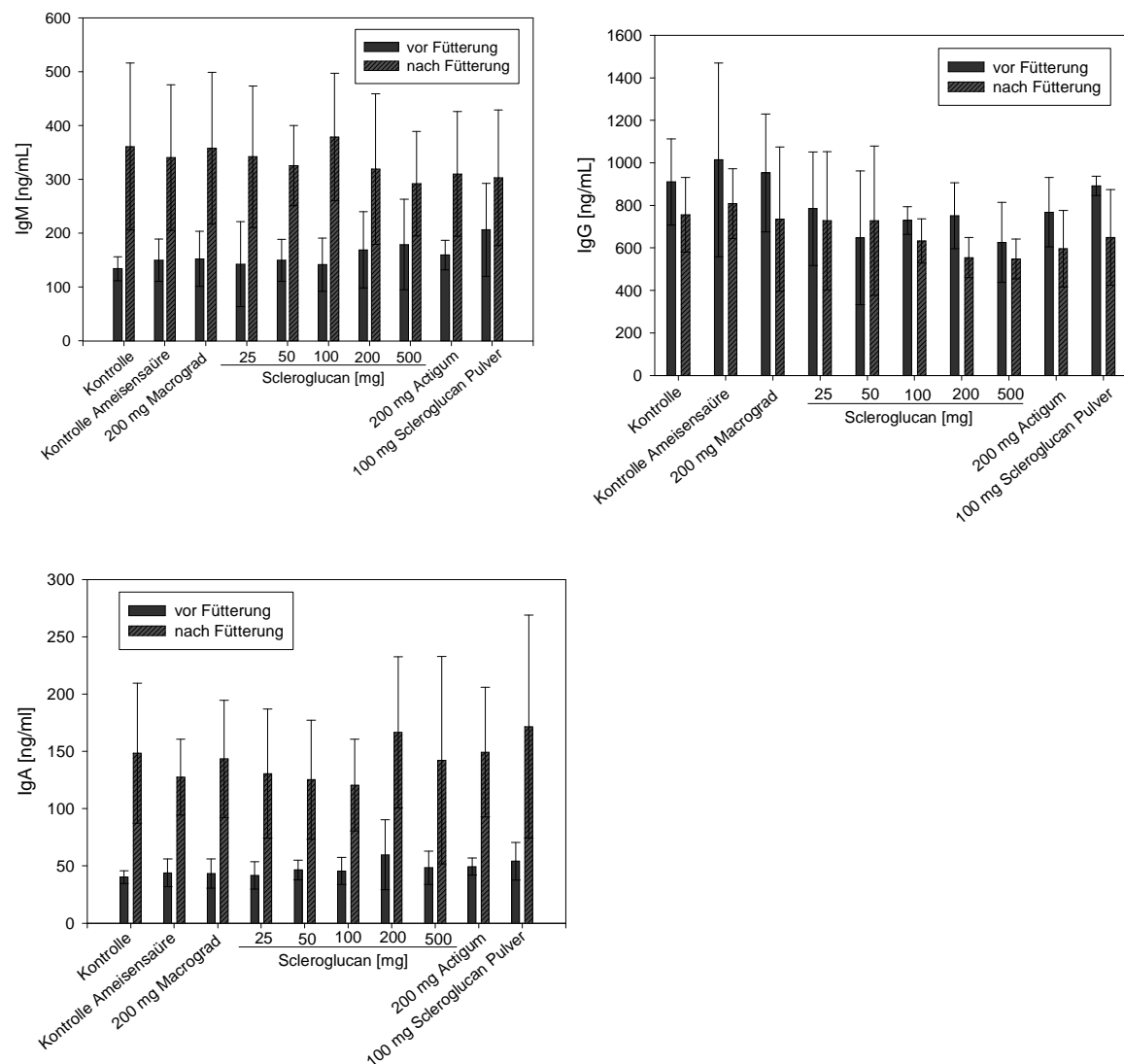


Abbildung 3-36: Einfluss verschiedener Scleroglucankonzentrationen auf die Freisetzung von TNF $\alpha$  (I) und IL-6 (II) aus gereiften DC's

### 3.5.2. Fütterungsversuch

Der Immunglobulin-Titer im Blut gibt Hinweise auf die Aktivität des Immunsystems. Untersucht wurde, ob die Fütterung von Scleroglucan einen Effekt auf den Titer von IgG, IgA und IgM hat. Dabei werden verschiedene Fütterungsparameter verglichen. Neben den Kontrollgruppen (Standardfutter bzw. Standardfutter mit Stabilisator Ameisensäure) wurde der Einfluss der Zugabe von wässriger Scleroglucanlösung in verschiedenen Dosierungen von 25 mg – 500 mg Scleroglucan und Scleroglucan-Pulver sowie kommerziell erhältlichem Scleroglucan (Macrograd und Actigum) untersucht. Es wurde eine Blutprobe vor Beginn der Versuche genommen und nach 5 Wochen Versuchsdauer. Für alle Versuchsgruppen zeigt sich, bezogen auf die Immunglobuline G, M und A, eine sehr hohe Standardabweichung zwischen den 8 Tieren pro Versuchsgruppe. Dieses ist jedoch beim Versuchstier Schwein nicht anders zu erwarten, da es sich nicht um Inzuchtstämme handelt und die Versuchstierzahl nicht ausreichend ist um statistische auswertbare Ergebnisse zu erhalten.



**Abbildung 3-37: Konzentration der Immunglobuline A, G und M vor und nach der Fütterung**

Die Abbildung 3-37 zeigt, dass während der Versuchsdauer der IgG Titer im Blutplasma abnimmt. Es ist kein Effekt durch die Zugabe von Scleroglucan, Macrograd oder Actigum erkennbar. Die Fütterung von Ameisensäure als Negativ-Kontrolle zeigt keinen Einfluss. Die erkennbaren Unterschiede im Immunglobulintiter zwischen Beginn des Experiments (Blutentnahme vor der Fütterung) und nach Beendigung der 5-wöchigen Fütterung sind auf eine normale Veränderung zurückzuschließen (Stalljohann, 2006). Als Schlussfolgerung geht aus den Versuchen hervor, dass die Stabilisierung mit Ameisensäure keine Auswirkung zeigt. Die Fütterung des Scleroglucans in den verschiedenen Aggregatzuständen (flüssig oder fest) hat ebenfalls keinen Einfluss. Die Fütterung der schon kommerziell erhältlichen Glucane ebenfalls nicht.

### 3.5.3. Inkubation von Scleroglucan mit Darminhalt

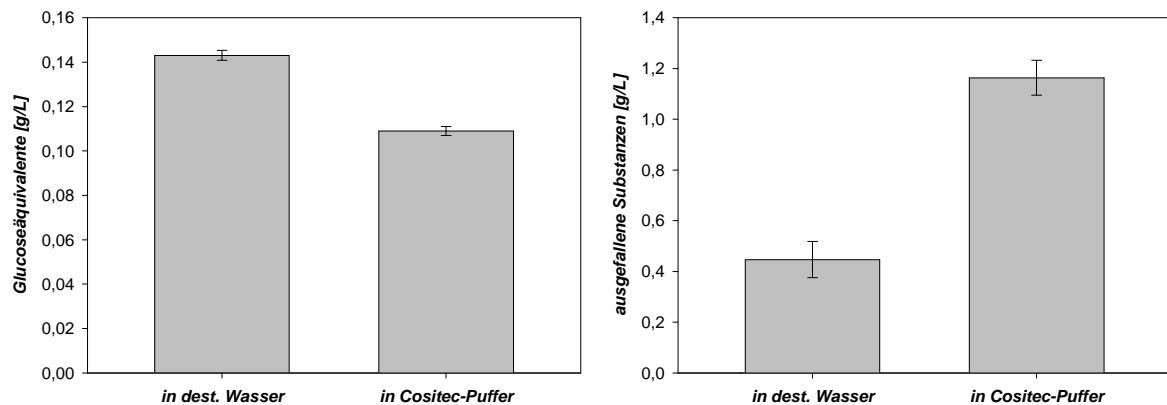
Nachdem die Ferkel-Fütterung mit Glucanen nicht aussagekräftig verlief, sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß Scleroglucan im Darm verschiedener Tiere abgebaut wird. Gefriergetrockneter Darminhalt wurde von Prof. Breves, Physiologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

#### 3.5.3.1. Verifizierung der Methode

Zur Überprüfung der Auswirkungen des Darminhaltes auf das Scleroglucan, wird auf schon entwickelte Methoden zurückgegriffen. Hierbei ist es wichtig zu prüfen, ob die verwendeten Puffer oder der Darminhalt einen Einfluss auf diese Methoden haben. Dazu werden Vorversuche durchgeführt um zu testen, ob die Bestimmung des Polysaccharidgehaltes und die Bestimmung der reduzierenden Enden möglich ist.

##### Einfluss des Puffers

Als erstes wurde das Löslichkeitsverhalten des Darminhaltes in deionisiertem Wasser und Cositec-Puffer bestimmt. Dazu wurde Darminhalt in deionisiertem Wasser bzw. Cositec-Puffer gelöst und anschließend filtriert (Abschnitt 2.2.27.1). Aus dem Filtrat wurden die reduzierenden Enden bestimmt und die Fällbarkeit in Isopropanol getestet. Um einen Einfluss des Puffers auf die Messung auszuschließen, wurde eine Messung mit Wasser und Puffer durchgeführt. Die Messung mit Puffer ergab einen leicht geringeren Wert im Vergleich zu Wasser. Durch den Darminhalt hat die Lösung nach der Inkubation eine leicht bräunliche Färbung, was zu einer Eigenabsorption und eine Messwerterhöhung von 0,0118 g/L ( $\pm 0,0006$ ) führt. Beide Einflüsse sind gegenläufig und heben sich auf, daher werden sie in die weitere Berechnung nicht mit einbezogen. Die Ergebnisse der reduzierenden Enden, bestimmt nach Somogyi & Nelson, sind in Abbildung 3-38 (links) dargestellt. Für den Darminhalt in Puffer gelöst ergeben sich um 20 % geringere Werte bei der Bestimmung der reduzierenden Enden.

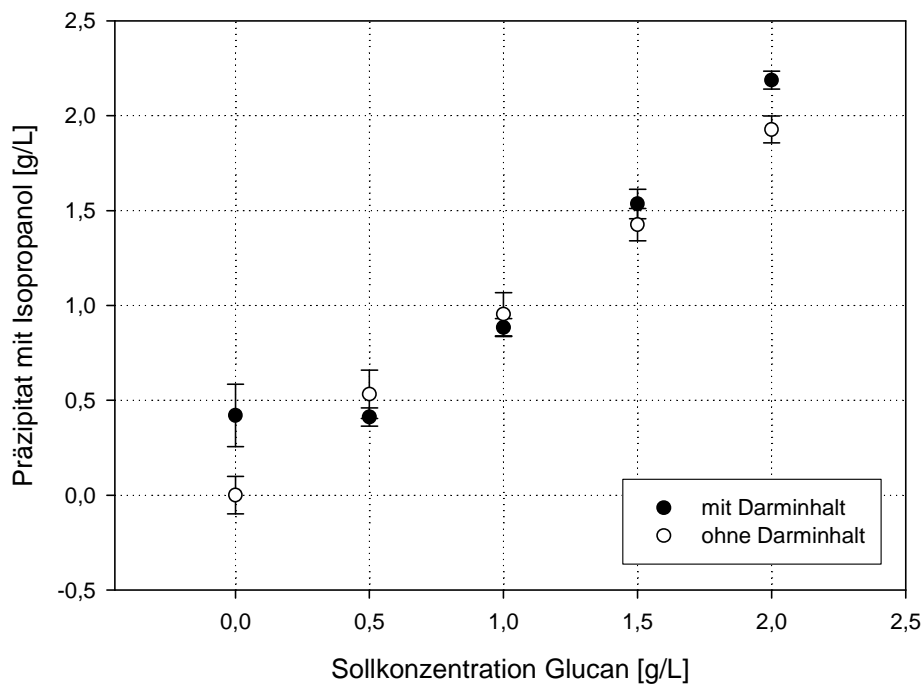


**Abbildung 3-38:** Konzentration der reduzierenden Enden (nach Somogyi & Nelson) des Darminhaltes in Wasser bzw. Cositec-Puffer (links). Konzentration der ausgefallenen Substanzen mit Isopropanol in Wasser bzw. Cositec-Puffer (rechts)

Die Ergebnisse der Fällungsversuche mit Isopropanol sind in Abbildung 3-38 (rechts) dargestellt. Hier ergibt sich ein 3fach höherer Wert für die ausgefallenen Substanzen in Cositec-Puffer gegenüber dem in Wasser, was auf die Salze des Puffers zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde die Fällung in 20 Versuchen mit reinem Cositec-Puffer durchgeführt und aus den ermittelten Gewichten der Salze wurde ein Mittelwert von 0,948 g/L berechnet. Bei allen folgenden gravimetrischen Bestimmungen bei denen Puffer verwendet wurde, wird dieser Mittelwert vom gemessenen Gewicht abgezogen.

### Einfluss des Darminhaltes

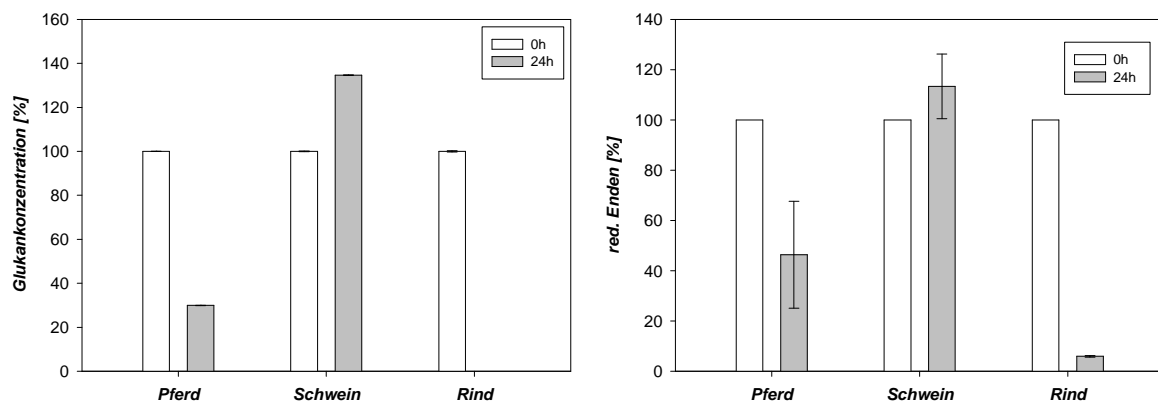
Für die Überprüfung, ob eine gravimetrische Scleroglucankonzentrationsbestimmung in Verbindung mit Isopropanolfällung ohne Beeinflussung durch den Darminhalt möglich ist, wurden unterschiedliche Glucankonzentrationen mit und ohne Darminhalt 24 h in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die daraus ermittelten Konzentrationen sind in Abbildung 3-39 dargestellt. Es ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Eine größere Abweichung tritt bei 0 g/L und 2 g/L Scleroglucan auf. Hier wird nach der Inkubation mit Darminhalt ein höherer Gehalt bestimmt.



**Abbildung 3-39:** Inkubation von verschiedenen Scleroglucankonzentrationen mit Darminhalt für 24 h bei 38 °C und pH 4. Auftragung der gemessenen Scleroglucankonzentration nach Fällung mit Isopropanol gegen die eingesetzte Konzentration.

### 3.5.3.2. Batch-Versuch

Zur Simulation der Zersetzung des Scleroglucans im Darm des Tieres wurde unter lebensnahen Bedingungen in einem Batch-Ansatz der jeweilige Darminhalt (Pferd, Schwein und Rind) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand für die Bestimmung der reduzierenden Enden, Viskosität und hochmolekularem Scleroglucan verwendet. Parallel dazu wurde ein Ansatz mit Puffer statt Glucan mitgeführt, der zur Korrektur der Werte dient. Diese Werte sind in Abbildung 3-40 nicht dargestellt.



**Abbildung 3-40:** Konzentration des fällbaren Glucans mit Isopropanol und der red. Enden einer 2 g/L Scleroglucanlösung vor und nach 24 h Inkubation mit Darminhalt.

Das viskose Verhalten der Scleroglucanlösung nach Inkubation ist in Abbildung 3-41 dargestellt. Bei der Betrachtung des Pferdedarminhalts (Caecum) und Rinderdarminhalts (Pansen) sind starke Veränderungen zu erkennen. Die Konzentration des fällbaren Glucans geht beim Pferd auf 25 % und beim Rind auf 0 % zurück. Die reduzierenden Enden nehmen beim Pferd auf 50 % und beim Rind auf 5 % ab. Beim Schwein (Caecum) hingegen ist eine Zunahme an fällbarem Präzipitat sowie an reduzierenden Enden erkennbar. In der Messung der Viskosität ist beim Schwein nur eine geringe Veränderung im niedrigen Scherratenbereich zu erkennen. Beim Pferd spiegelt sich der deutliche Abbau auch in der Viskositätserniedrigung wieder. Beim Rind war die Bestimmung der Scherviskosität gegenüber der Scherrate nicht möglich. Der Abbau des Scleroglucans war schon zu weit vorangeschritten.

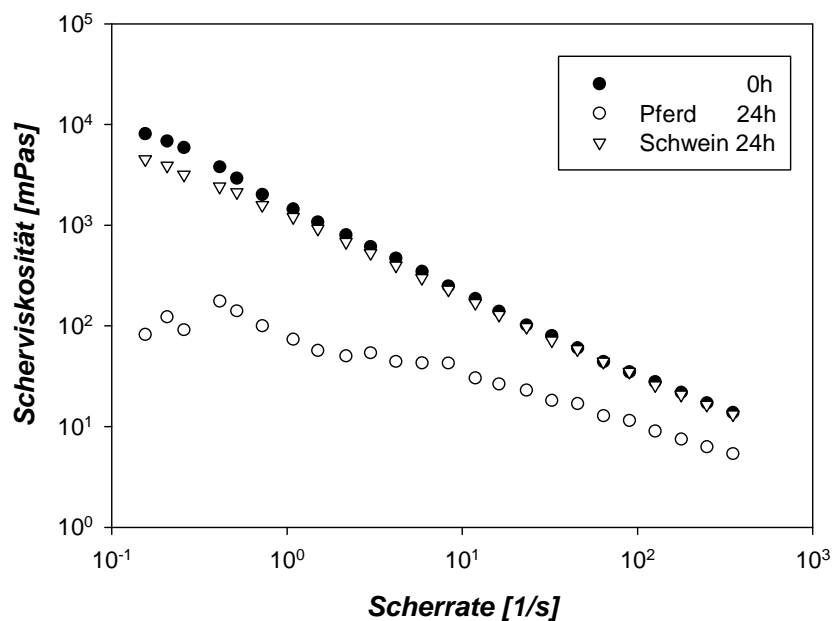


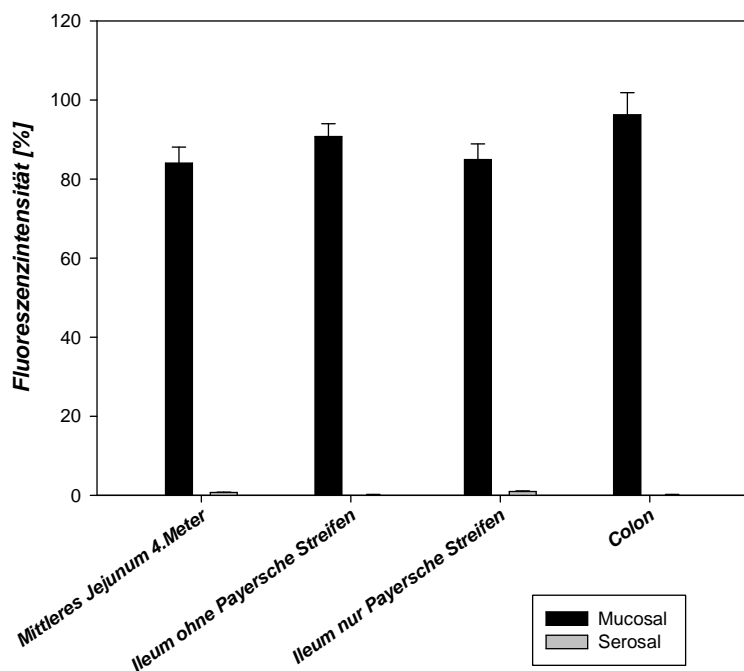
Abbildung 3-41: Scherviskosität der Scleroglucanlösung vor und nach der Inkubation mit Darminhalt, gemessen mit einer Schertreppe von 0,1 bis 350 1/s

#### 3.5.4. Transport durch die Darmwand

Das mit 5-DTAF Fluoreszenzmarkierte native Scleroglucan wurde verwendet, um zu testen, ob ein Transport durch den Darm des Schweines erfolgt. Dazu wurden 200 µL einer Scleroglucanlösung mit 2 g/L zu 10 mL der Elektrolytlösung auf der mucosalen Seite einer präparierten Darmwand (Ussing-Kammer, Kap. 2.2.26) gegeben. Erfolgt ein Transport durch die Darmwand muss Scleroglucan auf der serosalen Seite zu finden sein. In Abbildung 3-42



ist die Fluoreszenz in Prozent dargestellt. Dabei wurde die Nullprobe, gleiche Menge Scleroglucanlösung auf 10 mL Elektrolytlösung bei gleicher Temperatur (37 °C) und Versuchsdauer (2 h), auf 100 % gesetzt, um den Einfluss der Versuchsbedingungen auf den Fluoreszenzfarbstoff auszuschließen. Es erfolgte pro Darmabschnitt (mittleres Jejunum, Ileum mit bzw. nur payersche Streifen und Colon) eine Bestimmung in Triplikat. In Abbildung 3-42 ist zu erkennen, dass für alle untersuchten Darmabschnitte fast 100 % Fluoreszenz auf der mucosalen Seite verbleiben. Der geringe Anteil von unter 1 %, der auf der serosalen Seite zu finden ist, geht auf freies 5-DTAF in der Scleroglucanlösung zurück. Es ist kaum möglich, freies 5-DTAF beim Markierungsvorgang komplett aus der Scleroglucanlösung zu entfernen.



**Abbildung 3-42: Fluoreszenzmarkiertes Scleroglucan nach Transportversuch durch den Schweinedarm im Jejunum, Ileum mit und ohne payersche Streifen und dem Colon; Probenaufgabe: mucosale Darminnenseite**

## 4. Diskussion

### 4.1. Molekulargewichtsbestimmung von Scleroglucan

Die Molekulargewichtsbestimmung des nativen Scleroglucans und der produzierten Fraktionen stellte eine Herausforderung dar. In der Literatur sind dazu sehr unterschiedliche Angaben  $3,0 \times 10^5$  bis  $6,4 \times 10^6$  (Pretus et al., 1991) sogar  $5 - 12 \times 10^7$  (Stokke et al., 1992, Brigand, 1993) zu finden. In den genannten Beispielen fehlen genaue Daten zur Kalibrierung, Produktion und Aufreinigung des Scleroglucans. Damit ist ein direkter Vergleich mit den oben vorgestellten Daten, die mit der GPC-Methode gekoppelt an einen Viskositätsdetektor ermittelt wurden, zwar möglich, aber die Ursache für unterschiedliche Molekulargewichte bleibt unbekannt.

In der Abbildung 3-2 sind Messungen von Pullulan-Standards mit einer Flussrate von 1 mL/min und 0,5 mL/min aufgetragen. Hier zeigt sich bei der Darstellung der Elutionsvolumina gegenüber dem Molekulargewichten eine Verschiebung der Standards hin zu geringeren Elutionsvolumina, wenn die Flussrate auf 0,5 mL/min reduziert wird. Dieses Verhalten ist bei  $> 200.000$  g/mol zu beobachten. Daher ist anzunehmen, dass bei einer Flussrate von 1 mL/min Standards  $> 200.000$  g/mol nicht durch das gesamte Porenmaterial wandern konnten. Bei den geringeren Molekulargewichten allerdings zeigt sich ein deckungsgleiches Elutionsvolumen. Daher wurde die geringe Flußrate von 0,5 mL/min verwendet, um Gleichgewichtseinstellungen in der Trennsäule zu ermöglichen.

In der Abbildung 3-3 ist der Einfluss von Salzen und anderen Verunreinigungen aus der Produktion und von der Stabilisierung des Scleroglucans bei der Messung mit einem Brechungsindex-Detektor dargestellt. Die Proben, welche nicht gegen den Eluenten durch Dialyse aufgereinigt wurden, zeigen Phantom-Peaks. Nicht nur im Bereich der Ausschlussgrenze der Dialysemembran, sondern besonders im hochmolekularen Bereich bei ca. 8 min. Es findet dort eine Überlagerung bzw. Verdeckung des eigentlich relevanten Peaks statt. Bei etwa 10 min sind Peaks vorhanden, die nach der Dialyse nicht mehr gemessen werden können und oberhalb des Ausschlussvolumens der Membran liegen. Die Wahl des optimalen Elutionsvolumens mit validierter Probenvorbereitung ist daher gerade bei technisch hergestellten Produkten mit geringer Reinheit besonders Wichtig.

Als konventionelle Kalibrierung wird diejenige bezeichnet, bei der die Ermittlung des Molekulargewichtes dadurch erfolgt, dass ein Zusammenhang zwischen dem hydrodynamischen Volumen ( $V_h$ ) und dem Elutionszeitpunkt erstellt wird. Da Scleroglucan-

Standards kommerziell nicht erhältlich sind, wurde eine Kalibrierung mit Pullulan-Standards durchgeführt. Pullulan ist, wie Scleroglucan, ein lineares und wasserlösliches Polysaccharid. Pullulane besteht aus Maltotriose-Einheiten, bei denen die Glucose über  $\alpha$ -1,4-glycosidische Bindungen verküpft sind. Die Maltotriose-Einheiten sind über eine  $\alpha$ -1,6-Verbindung mit einander gekoppelt. Demnach fehlt dem Pullulan die für Scleroglucan typische Substituierung eines  $\beta$ -1,6 verbundenen Glucosemoleküls an jedem dritten Molekül der  $\beta$ -1,3-Grundkette. Die Abbildung 3-4 zeigt den kalibrierten Bereich von 16 – 24 mL/min in welchem die zu vermessende Probe liegen sollte. Eine genaue Molekulargewichtsbestimmung von Molekülen die außerhalb dieses Bereiches liegen ist nicht möglich. Aus diesem Grund wurde mit der universellen Kalibrierung gearbeitet, d.h. es wurden eigene Scleroglucan-Standards hergestellt und vermessen. In der Abbildung 3-7 ist eine universelle Kalibrierung mit den Pullulan-Standards abgebildet. Da das native Scleroglucan weiterhin außerhalb des Kalibrierbereiches liegt, wurde über die Mark-Houwink-Beziehung ein Punkt bei 12 mL/min Elutionsvolumen durch Extrapolation bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-9 dargestellt. Die Molekulargewichtsbestimmung für das Scleroglucan konnte durch eigene Standards weiter optimiert werden. Ein Vergleich der Kalibrierfunktionen unter der Verwendung der Scleroglucan-Standards mit der extrapolierten Funktion zeigt, dass der Anstieg der Kurve wesentlich flacher verläuft. Die gerechtfertigte Nutzung der universellen Kalibrierung ist gegeben durch den Umstand, dass die Scleroglucan-Standards mit den Pullulan-Standards auf einer Kurve liegen. In der Literatur basieren solche Untersuchungen meistens auf chemisch hergestellten Polymeren. Die Beschreibung der universellen Kalibrierung für Polystyrol, Polyvinylchlorid und Polybutadien erfolgte bereits 1967 (Grubisic et al., 1967). Für Molekulargewichtsbestimmungen von löslichem Scleroglucan mittels Größenausschlußchromatographie (GPC) welche mit Brechungsindex- und Viskositätsdetektoren gekoppelt worden ist, sind keine entsprechenden Literaturdaten zu finden. Dagegen existierten Daten zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Scleroglucan über Mehrwinkellichtstreuung (MALLS multiangle laser-light scattering) (Sletmoen et al., 2006).

Neben der Möglichkeit eine universelle Kalibrierung durch die ermittelten Daten aus dem Viskositätsdetektor zu erstellen und so von Polymeren, von denen keine Standards zu erwerben sind, das Molekulargewicht zu bestimmen, stellt die Kopplung mit einem Viskositäts- und Brechungsindex-Detektor auch eine kostengünstige Alternative gegenüber der Lichtstreuung dar. Der Viskositätsdetektor ist ab einem Molekulargewicht von ca. 20.000 g/mol einsetzbar. Nach oben sind keine Grenzen bekannt. Bei der Lichtstreuung muss auf

Molekulargewichtsbereiche und Polymerform geachtet werden. So bietet sich mit der Rechtwinkellichtstreuung (RALLS Right angle laser light scattering) zwar ein kostengünstiger Detektor an es können aber nur kompakte Moleküle vermessen werden. Hingegen werden für Molekulargewichte  $< 200.000 \text{ g/mol}$  oft zu geringe Molekulargewichte ermittelt. Mit der Kleinwinkellichtstreuung (LALLS Low angle laser light scattering) können Molmassenergebnisse ohne Extrapolation ermittelt werden. Mit dieser Methode können jedoch keine Trägheitsradien oder Strukturinformationen bestimmt werden. Außerdem zeigte sich bei dieser Methode eine hohe Beeinflussung des Signals durch Luftblasen oder Partikel. Die Mehrwinkellichtstreuung ist für Molekulargewichte mit einer Molmasse von  $> 200.000 \text{ Da}$  geeignet und die Streuintensität wird hier bei mehreren Winkeln gleichzeitig gemessen. Des Weiteren ist es möglich, den Trägheitsradius und die Strukturinformationen zu erhalten. Der Mehrwinkellichtstreudetektor ist in der Anschaffung der teuerste Detektor. Neben der Entscheidung für einen Lichtstreudetektor muss bei der Lichtstreuung auch immer die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Konzentration ( $dn/dc$ ) bekannt sein. Hier zeigt sich der Vorteil der GPC gekoppelt mit einem Viskositätsdetektor, da bei bekannter Probenkonzentration nicht die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Konzentration bestimmt werden muss. Abschließend kann festgehalten werden, dass mit dem Viskositätsdetektor eine Vielzahl von Substanzen mit variablem Molekulargewicht bestimmt werden kann.

## 4.2. Modifizierung von Scleroglucan

In vielen Untersuchungen wurden endo- $\beta$ -1,3-spaltende Glucanasen nicht auf ihre Aktivität gegenüber Scleroglucan sondern auf Laminarin als Substrat getestet (Thrane et al., 1997). Laminarin ist dem Scleroglucan strukturell sehr ähnlich und ist ein (1-3)- $\beta$ -D-Glucan mit (1-6)- $\beta$ -Glucose Seitenketten, die im Gegensatz zu Scleroglucan nicht regelmäßig substituiert sind. Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit konnte keine Spaltung des Scleroglucans durch die Enzyme GH16 und GH81 (Tabelle 3-3) am Scleroglucan festgestellt werden, obwohl diese Laminarin hydrolysieren können. Bei allen Enzymen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, konnte keine reine Endo-Enzymaktivität (Tabelle 3-3) festgestellt werden. Die Untersuchung der Proteinzusammensetzung der Enzymgemische (Abbildung 3-11) lässt vermuten, dass unter der Vielzahl von Proteinen durchaus auch eine Endo-Glucanase vorhanden sein könnte. Beispielsweise könnte es sich bei dem Protein mit 75 kDa um eine Endo-Glucanase handeln, da diese genauso wie auch das im Kulturüberstand von *T. harzianum* CECT 2413 nachgewiesene Protein sehr nah an dem aus der Literatur hervorgehenden Wert für eine endo- $\beta$ -(1,3)-Glucanase von 74 kDa liegt (El-Katatny et al., 2000). Unter Umständen besitzen diese Endo-Glucanasen jedoch eine viel geringere Aktivität als die enthaltenen Exo-Glucanasen, sodass der Anteil von hochmolekularen Spaltprodukten nur sehr gering ist und/oder die durch die Endo-Glucanasen erzeugten Spaltprodukte höheren Molekulargewichts sofort von den Exo-Glucanasen hydrolysiert werden und daher bei der Untersuchung mit der GPC-Methode nicht als separate Fraktionen erscheinen. Ein weiterer Grund könnte in der geringen Konzentration in den Fraktionen begründet sein. In Abbildung 3-12 ist eine Differenz zwischen gebildeter Glucose und der detektierten Menge an reduzierenden Enden zu sehen. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf Spaltprodukte, welche durch die Endo-Glucanase gebildet wurden. Die Molmassenverteilung (Abbildung 3-13) zeigt sowohl den Abbau des hochmolekularen Scleroglucans in kleinere Produkte als auch die Neubildung eines Peaks bei ca. 700 g/mol. Diese Fraktionsgröße liegt jedoch nicht im angestrebten Molekulargewichtsbereich von circa 5.000 – 10.000 g/mol. Bimczok et al. konnte bereits zeigen, dass diese Molekulargewichtsfraction die höchste immunmodulierende Kapazität besitzt.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse mit den in der Literatur diskutierten Abbauprodukten der Hydrolyse, verwundert dieses Ergebnis nicht. Zwar werden häufig Endo- $\beta$ -(1,3)-Glucanasen beschrieben, jedoch ist eine Endo-Aktivität dabei nur gegenüber

unverzweigten  $\beta$ -(1,3)-D-Glucanenen festzustellen und/oder die Aktivität gegenüber Scleroglucan wurde nicht getestet (Martín-Cuadrado et al., 2003, Martin et al., 2007, Cheng et al., 2009). Zudem besitzen die von der Firma Erbslöh bezogenen Enzyme auch eine  $\beta$ -(1,6)-Aktivität, da Scleroglucan immer vollständig zu Glucose abgebaut wurde und somit keine Gentiobiose eintrat. Eine solche Aktivität ist ebenfalls aus der Literatur bekannt (Kawai et al., 2006). Über eine mögliche Spaltung von Scleroglucan durch die potentiell in den Enzymgemischen enthaltenen Chitinasen konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden. Bei einem Versuch zur Hydrolyse von Laminarin mit drei aus *T. harzianum* CECT 2413 aufgereinigten Chitinasen wurde eine äußerst geringe Aktivität festgestellt (de la Cruz et al., 1995d).

*T. harzianum* CECT 2413 ist ein mykoparasitischer Pilz, der mindestens drei extrazelluläre Enzyme mit  $\beta$ -(1,3)-Glucanase-Aktivität in einem chitinhaltigem Medium freisetzt (de la Cruz et al., 1995d). Dabei ist die Funktion dieser Enzyme unbekannt. Es wird vermutet, dass sie eine Rolle in der Ernährung des Pilzes spielen, wenn  $\beta$ -Glucane als Substrate (Stahmann et al., 1992) vorliegen, welches im Mykoparasitismus eine Rolle spielt oder für morphogenetische Funktionen beim Wachstum und der Entwicklung nötig ist. Während der Differenzierung des Pilzes spielen  $\beta$ -(1,3)-Glucanasen der Pilze eine wichtige Funktion (Adams, 2004). Sie steuern die  $\beta$ -Glucanbildung in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot (Pitson et al., 1993). Des Weiteren stellen sie eine primäre Angriffswaffe gegen parasitären Pilzzellwandabbau dar (Stone and Clarke, 1992, Pitson et al., 1993, De la Cruz et al., 1995e, Amey et al., 2003). Es konnte in der Literatur bereits gezeigt werden, dass die  $\beta$ -Glucanasen mit Hilfe von Chitin als einzige Kohlenstoffquelle vom Pilz *T. harzianum* gebildet werden. In *T. longibrachiatum* wird die  $\beta$ -(1,3)-Glucanase-Aktivität in Abhängigkeit von dem Pilzwachstum produziert (Tangarone et al., 1989).

In anderen Pilzen, wie *Botrytis cinerea* (Stahmann et al., 1992), *Penicillium italicum* (Sanger et al., 1977), *Penicillium oxalicum* (Copa-Patiño et al., 1989) und *Sclerotium glucanicum* (Rapp, 1992a) wird in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot die  $\beta$ -(1,3)-Glucanase-Aktivität geregelt. In nährstoffarmen Zeiten kommt es zur Produktion von Glucanasen, die zur Gewinnung von Glucose aus Glucanen genutzt werden. Damit verbunden ist eine Autolyse der Zellwand. Die Autolyse kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Eine Möglichkeit ist das Erzeugen von Kohlenstoffmangel. Hier wurde unmittelbar vor der Autolyse die verstärkte Produktion von  $\beta$ -Glucanasen in *Botrytis spp.* (Stahmann et al., 1992), *Penicillium oxalicum* (Copa-Patiño et al., 1989) und *Aspergillus nidulans* (Nuero et al., 1993) festgestellt.

Das katalytische Zentrum, welches für die Hydrolyse durch  $\beta$ -(1,3)-Glucanasen verantwortlich ist, wurde bis heute nicht identifiziert (Martin et al., 2007). Aus diesem Grund wurden Sequenzalignments durchgeführt und es konnten Aminosäuren in besonders stark konservierten Sequenzen identifiziert werden, welche als an der Hydrolyse beteiligt angesehen werden (Martin et al., 2007).

Der Versuch, das katalytische Zentrum bei Glucanasen aus Pilzen und Hefen zu identifizieren, ist ebenfalls noch nicht gelungen. Aus diesem Grund wurden Sequenzvergleiche auf Proteinebene durchgeführt und die Substratspezifität überprüft. Der Vergleich von Endo  $\beta$ -(1,3)-Glucanasen aus *Saccharomyces cerevisiae* mit der Aktivität aus zwei weiteren Endo  $\beta$ -(1,3)-Glucanasen aus *Schizosaccharomyces pombe* zeigte, dass diese nur lineare  $\beta$ -(1,3)-Glucane hydrolysieren (Martín-Cuadrado et al., 2003). Es konnte jedoch beim Vergleich mit einer Endoglucanase aus *Chlostridium thermocellum* eine 404 Aminosäuren lange Sequenz identifiziert werden. Innerhalb dieser Sequenz befinden sich vier konservierte Asparagin- und Glutaminsäure-Reste, die für die enzymatische Aktivität verantwortlich sind. Die Isolierung von drei  $\beta$ -(1,3)-Glucanasen aus *Sclerotium glaucum* identifizierte eine Endo- und zwei Exoglucanasen. Die Endoglucanase soll die Fähigkeit haben Scleroglucan zu hydrolysieren (Rapp, 1992a).

In der Literatur sind viele Endo- $\beta$ -1,3-Glucanasen beschrieben. In Tabelle 4-1 sind einige von ihnen zusammen gefasst. Die Enzymaktivität wird dabei oft an Laminarin getestet, welches ein lineares  $\beta$ -(1,3)-Glucan mit nur sehr wenigen Verzweigungen ist.

**Tabelle 4-1: Einige Beispiele für  $\beta$ -Endoglucanasen aus Pilzen und Hefe**

Organismus	Genname	Enzymtyp	Referenz
Trichoderma virens	Tv-bgn1	Endo $\beta$ -(1,3): 1,6*	(Kim et al., 2002)
Trichoderma virens	Tv-bgn2	Endo $\beta$ -(1,3)	(Kim et al., 2002)
Trichoderma harzianum	bgn13.1	Endo $\beta$ -(1,3)	(De la Cruz et al., 1995e)
Trichoderma viride	l amA1	Endo $\beta$ -(1,3): 1,6*	(Nobe et al., 2004)
Aspergillus fumigatus	ENGL1	Endo $\beta$ -(1,3)	(Mouyna et al., 2000)

\* Aktivität noch nicht eindeutig geklärt

In der Literatur wird nur eine Endo- $\beta$ -(1,3)-Glucanase beschrieben, die spezifisch Scleroglucan und Schizophyllan hydrolysiert ohne die Seitenkette zu entfernen (Rapp, 1992a). Die meisten beschriebenen Glucanasen entfernen die  $\beta$ -(1,6)-Verzweigungen und hinterlassen einen linearen  $\beta$ -(1,3)-Glucanstrang (Kawai et al., 2006). Eine für die Hydrolyse von Scleroglucan vielversprechende Endo- $\beta$ -(1,3)-Glucanase wurde aus *Trichoderma*

*harzianum* CECT 2413 isoliert (de la Cruz et al., 1995a). Das Enzym (E.C. 3.2.1.39) besteht aus 762 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66,2 kDa. Die Aufreinigung des Enzyms zeigte, dass es aus drei Domänen besteht: einem N-terminalen Signalpeptid, einer noch nicht näher bestimmten Sequenz und einer Cystein reichen C-terminalen Sequenz. Ein Sequenzvergleich ergab, dass es zu der Familie 55 der Glycosylhydrolase gehört.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von BGN13.1 mit anderen  $\beta$ -Glucanasen zeigte keine signifikante Homologie (de la Cruz et al., 1995a). Hingegen zeigte ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von  $\beta$ -Glucanasen aus Hefe- und Pflanzenzellen relevante hoch konservierte Regionen der abgeleiteten Primärstrukturen. Die Boxen, bestehend aus den Proteinen VXEXGWP und EXXXGXF, liegen innerhalb der nucleophilen katalytischen Zentren. Diese Boxen sind jedoch nicht in der Glucanase BGN13.1 vorhanden (Chen et al., 1993, Keitel et al., 1993). Eine weitere Box EXDXE, welche in bakteriellen Glucanasen vorhanden ist, fehlt in BGN13.1.

Daher zeigte die Primärstruktur des BGN13.1 zwei wesentliche Unterschiede in Bezug auf andere  $\beta$ -Glucanasen: erstens fehlen bei BGN13.1 die konservierten Regionen in den untersuchten  $\beta$ -Glucanasen. Zweitens enthält BGN13.1 ein cysteinreiches Motiv, welches in anderen bekannten  $\beta$ -Glucanasen fehlt, mit Ausnahme der  $\beta$ -1,3-Glucanase aus dem Bakterium *Oerskovia xanthineolytica*. Das Entfernen der cysteinreichen carboxyterminalen Region aus dem bakteriellen Protein hat keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität. Es wird davon ausgegangen, dass damit die Möglichkeit verbessert wird, mit der Hefezellwand zu interagieren (Shen et al., 1991). Die rekombinante Produktion des Gens BNG13.1 ohne die cysteinreiche Region stellte sich jedoch als schwieriger heraus als die Herstellung des unveränderten BGN13.1 Proteins (Abbildung 3-33). Es könnte demnach möglich sein, dass diese cysteinreiche Funktion für die Faltung des Proteins wichtig ist. Ähnliche cysteinreiche Motive wurden auch in anderen Protein-Familien gefunden. Diese Proteine sind in der Lage, sich an spezifische Membran-Komponenten zu binden, wie die Saccharid bindenden Pflanzenlektine (z.B. Weizenkeimagglutinin); die Lipid-Transfer-Proteine von Tieren, Pilzen und Pflanzen, und die Klasse I Chitinasen (Drenth et al., 1980, Chasan, 1991).

Eine aus *Paenibacillus* sp. isolierte Glucanase mit 1793 Aminosäuren wurde von der Arbeitsgruppe um (Cheng et al., 2009) beschrieben. Dieses komplexe Protein setzt sich aus einigen funktionellen Bereichen zusammen. Vom N- zum C-Terminus sind das ein Signalpeptid, drei homologe Wiederholungen des S-Layer-Moduls, ein katalytisches Modul der Glycoside-Hydrolase-Familie 16, welches spezifisch  $\beta$ -(1,3)- und  $\beta$ -(1,3)-(1,4)-Glucane



hydrolysiert, vier Wiederholungen eines kohlenhydratbindenden Modulen (CBM\_4\_9) und ein Analogon des Gerinnungsfaktors Fa5/8C. Dem kohlenhydratbindenden Modul und dem Gerinnungsfaktor Fa5/8C wird nachgesagt, die Hydrolyse von  $\beta$ -(1,3)-(1,4)-Glucanen,  $\beta$ -(1,3)-Glucanen und  $\beta$ -(1,4)-Glucanen zu unterstützen.

Neben den  $\beta$ -(1,3)-Glucanasen, die von *T. harzianum* produziert werden, wurden auch drei  $\beta$ -(1,6)-Glucanasen beschrieben (De la Cruz et al., 1995c, De La Cruz and Llobell, 1999). In den von uns produzierten Enzymen konnte keine  $\beta$ -(1,6)-Glucanase Aktivität nachgewiesen werden. In der Literatur wird die Induktion der  $\beta$ -(1,6)-Glucanase BGN16.3 durch Zellwandbestandteile beschrieben (Montero et al., 2005) und nicht bei einer Induktion über Chitin. In unserem Versuchsansatz erfolgte ebenfalls die Induktion über Zellwandbestandteile von *S. cerevisiae*. Die Abhängigkeit der Enzymproduktion in Abhängigkeit vom Induktor wird besonders in dem Ansatz deutlich, in dem nur Scleroglucan als Induktor verwendet wurde. Hier war nur eine Proteinbande zu identifizieren. Der Aktivitätstest dieses Ansatzes zeigte aber sowohl Endo- als auch Exoenzymaktivität. Das könnte bedeuten, dass entweder die Glucanase zwei Zentren für Endo- bzw. Exoenzymaktivität besitzt, oder dass zwei Enzyme einen Komplex bilden.

Während der mykoparasitischen Wechselwirkungen der *Trichoderma* Stämme mit anderen Mikroorganismen werden viele Sequenzen mit hydrolytisch unterschiedlich wirkenden Enzyme gebildet. So konnte in einigen Stämmen bis zu 10 verschiedene Enzyme beschrieben werden (Lorito, 1998, Vázquez-Garcidueñas et al., 1998). Die Unterschiede liegen in der Substratspezifität und/oder den regulatorischen Eigenschaften vor (De La Cruz et al., 1992, Zeilinger et al., 1999, de las Mercedes Dana et al., 2001). Diese Erkenntnisse unterstützen die Idee einer synergetischen und/oder ergänzenden funktionellen Rolle der verschiedenen Isoenzyme für den antagonistischen Prozess, bei dem eine Vielzahl von Enzymen die komplexe Zellwand des Feindes überwinden muss.

Mit dem Enzym AS100 ist es gelungen, in einem größeren Hydrolyseansatz mit 40 g Scleroglucan 400 mg einer Fraktion mit einem Molekulargewicht von 5.685 g/mol (Abbildung 3-18) zu produzieren. Aus diesem Ansatz konnte jedoch keine weitere Fraktion aufgereinigt werden, d. h. dass auch in dem Enzymgemisch AS 100 eine wesentlich höhere Exo- als Endo-Aktivität vorhanden ist. Ein Vorteil dieses Enzymgemisches ist es, dass keine  $\beta$ -(1,6)-Enzymaktivität feststellbar ist (Abbildung 3-16).

Ein weiterer Ansatz mit dem Ziel Fraktionen mit definiertem Molekulargewicht herzustellen, war die regioselektive Hydrolyse mittels Bor-Silikat-Glas. Diese wurde schon von (Münzberg et al., 1995) mit Schizophyllan untersucht. Münzberg konnte durch

Inkubation in Duranglas bei 121 °C und 1 bar Druck verschiedenste Molekulargewichtsfractionen von Schizophyllan produzieren. Nach der gleichen Methode aber kürzerer Reaktionszeit, wurde der Versuch mit neuen Parametern mit Scleroglucan durchgeführt. In Abbildung 3-18 ist die Veränderung der reduzierenden Enden in Abhängigkeit von der Vorbehandlung und dem Reaktionsgefäß abgebildet. Demnach ist die Vorbehandlung durch Aufreinigung gegen den Eluent oder H<sub>2</sub>O wichtig, wenn die Reaktion in Polyethylen oder Edelstahl abläuft. Bei einer Inkubation in Duranglas wurde der vollständige Abbau beobachtet, unabhängig von der Vorbehandlung. Bei dem mit Ameisensäure stabilisierten Ansatz war keine Abhängigkeit gegenüber der Reaktionsoberfläche festzustellen. Es fand in allen Fällen ein vollständiger Abbau des Scleroglucans statt. Nach diesen Ergebnissen handelt es sich in dem Fall möglicherweise um eine Säurehydrolyse, da der pH-Wert der Lösung bei ca. 2 liegt. In den durch Dialyse gegen dH<sub>2</sub>O und NaN<sub>3</sub> vorbehandelten Ansätzen zeigte sich bei der Reaktion in Duranglas eine durch die Glasoberfläche begünstigte Hydrolyse. Bei den Reaktionen mit einem anderen Oberflächenmaterial wie Polyethylen oder Edelstahl war kein Unterschied ersichtlich. Der gegen NaN<sub>3</sub> dialysierte Ansatz zeigte keine Zunahme der reduzierenden Enden. Bei der Vorbehandlung durch Dialyse gegen dH<sub>2</sub>O stieg der Anteil der reduzierenden Enden auf ca. 200 %. Bei Betrachtung des Molekulargewichtes ist im Falle des Scleroglucans, welches gegen dH<sub>2</sub>O dialysiert wurde, eine Verringerung um circa 50 % von  $3,04 \times 10^6$  g/mol auf  $1,34 \times 10^6$  g/mol (Tabelle 3-4) zu beobachten. Es konnten jedoch keine weiteren Fraktionen ermittelt werden. Es ist demnach nicht möglich mit dieser Methode, im Gegensatz zum Schizophyllan, Molekulargewichtsfractionen zu produzieren. Das liegt möglicherweise an den unterschiedlichen Überstrukturen des Scleroglucans gegenüber dem Schizophyllan.

### 4.3. Rekombinante Produktion einer Glucanase

Für die Produktion einer Glucanase aus *T. reesei* wurden verschiedene Induktionsbedingungen getestet. Da der Pilz nur unter Glucosemangel Glucanasen bildet wurden verschiedene Kombinationen von Glucose, Chitin und *S. cerevisiae* als Edukte getestet (Tabelle 3-5). Anschließend wurde der Kulturüberstand mit Laminarin versetzt und der Abbau über die Zunahme der reduzierenden Enden bestimmt. Aus Abbildung 3-21 geht hervor, dass die stärkste Zunahme der reduzierenden Enden beim Zusatz von 0,1 % Glucose und *S. cerevisiae* vorliegt. Chitin in Kombination mit Glucose führt ebenfalls zu einem Anstieg der reduzierenden Enden. Wenn kein Induktor vorhanden und nur Glucose im Induktions-Medium ist, wird keine signifikante Zunahme beobachtet. In den Ansätzen, in denen keine Zugabe von Glucose erfolgte und nur der Induktor Chitin oder *S. cerevisiae* vorlag, ist ebenfalls ein Abbau des Laminarins zu erkennen. Er ist bei der Zugabe von *S. cerevisiae* jedoch nicht so stark wie bei der zusätzlichen Gabe von Glucose. Beim Chitin zeigen sich keine Unterschiede.

Die Versuche wurden auf Basis der Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe um (de la Cruz et al., 1995b) durchgeführt. Nach diesen Untersuchungen wird eine Glucanase mit der Größe von 66,2 kDa erwartet. Die Abbildung 3-22 zeigt die SDS-PAGE der Kulturüberstände in der kein Protein dieser Größe nachgewiesen werden kann. In einer sehr geringen Konzentration ist zwar eine Bande um 60 kDa erkennbar, aber diese ist im Vergleich zu den eindeutigen Banden bei 50 oder ca. 75 kDa schwächer. Die Aktivität in Bezug auf den Abbau von Laminarin, wie in Abbildung 3-21 zu sehen, beruht demnach auf dem Enzym mit 75 kDa, das zumindest zusätzlich eine Endo-Aktivität aufweist.

Der nachgewiesene Abbau von Laminarin wurde am Zielprodukt Scleroglucan überprüft. Aus der Abbildung 3-23 geht hervor, dass Scleroglucan ebenfalls von den Enzymen des Kulturüberstand abgebaut wird. Im folgenden Schritt wird versucht, die Bildung der Glucanasen durch Scleroglucan als Induktor zu optimieren. Zum einen, da es sich hier um das Zielprodukt handelt und zum anderen, weil Untersuchungen von *T. harzianum* und *S. rolfssii* zeigten, dass *T. harzianum* als Wachstumsinhibitor wirkt. Aus der Literatur ist bekannt, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Chitinase sowie einer Endoglucanase mit dem Mycoparasitismus von *T. harzianum* (El-Katatny et al., 2000) gibt. *S. rolfssii* ist der Produzent des Scleroglucans, bei dem es sich wiederum um einen Bestandteil seiner Zellwand handelt. Wie aus dem Artikel von El-Katatny et al. hervorgeht, führte die Zugabe eines

Kulturfiltrats von *T. harzianum* zur Wachstumsinhibition von *S. rolfssii*. Das Filtrat wies dabei eine Chitinase- (43 kDa) und  $\beta$ -(1,3)-Glucanase-Aktivität auf.

Im folgenden Experiment, zusammengefasst in Tabelle 3-6, wurde der Anteil von nativem Scleroglucan im Induktions-Medium schrittweise erhöht und parallel dazu der Anteil der Hefe reduziert. In dem Ansatz F ist schließlich nur noch Scleroglucan als Induktor vorhanden. Das Proteingel (Abbildung 3-24) der Kulturüberstände zeigt Banden bei ca. 74 kDa, 50 kDa und 30 kDa. Bei Ansatz F liegt jedoch nur eine Bande bei 74 kDa vor, auch verschwindet die Bande bei 50 kDa, wenn kein *S. cerevisiae* bzw. nur 0,2 % (w/v) vorhanden ist. Die Bande bei 50 kDa könnte eine Chitinase sein. Die Art der Enzymaktivität wurde mit der entwickelten GPC-Methode überprüft und es zeigte sich, dass in allen Fraktionen sowohl Exo- als auch Endoaktivität vorhanden ist (Abbildung 3-25 und Abbildung 3-26). Die Endoaktivität ist jedoch wesentlich höher, außer in den Ansätzen mit einem Anteil über 0,4 % *S. cerevisiae* (nach 24 h). Im Ansatz F ohne Hefe liegt der Anteil der gebildeten Glucose im Vergleich zur Bildung der reduzierenden Enden bei ca. 15 % nach 24 und 96 Stunden Kultivierung und unter 5 % nach 48 h Kultivierung. Aus der Abbildung 3-27 ist jedoch nicht die Bildung einer neuen hochmolekularen Fraktion ersichtlich, sondern die Bildung einer Fraktion mit 1.445 g/mol. Es kommt in allen Ansätzen zur Bildung dieser Molekulargewichtsfraktion. Hochmolekulare-Fraktionen sind jedoch nicht detektierbar. Dies könnte daran liegen, dass die Fraktionen gar nicht entstehen bzw. dass sie in einer so geringen Konzentration gebildet werden, dass keine Detektion möglich ist. Die Entstehung der Fraktion bei ca. 1.400 g/mol kann ein Hinweis darauf sein, dass diese Fragmentgröße von einer Endoglucanase bzw. Exoglucanasen nicht mehr erkannt wird.

Die Produktion des Enzyms BGN13.1 in löslicher Form war in *E.coli* BLR (DE3) möglich, aber es konnte keine Aktivität nachgewiesen werden und das produzierte Enzym war somit nicht funktionsfähig. Der Arbeitsgruppe Nakazawa ist es gelungen, mit Hilfe des *E. coli* Stammes Rosetta-gami B (DE3) pLacI drei Endoglucanasen aus *T. reesei* in *E. coli* zu produzieren (Nakazawa et al., 2008). Die Glucanasen hatten ein Molekulargewicht von 45 kDa, 34 kDa und 27 kDa und der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte allein über die Bestimmung der reduzierenden Enden. Es ist demnach fraglich, ob es sich um eine Endoaktivität handelt. Für unsere Anwendung sind die Enzyme nicht interessant, da keine Aktivität an Laminarin nachgewiesen werden konnte. Für die Produktion der Endoglucanase BGN13.1 kann ein Wechsel des Expressionssystems von einem Bakterium zu einer Hefe die Ergebnisse verbessern. Das konnte bei der Produktion einer Endo- $\beta$ -(1,6)-Glucanase in *S. cerevisiae* (Lora et al., 1995a) und in *P. pastoris* (Gao et al., 2008) bereits gezeigt werden.

Die erfolgreiche rekombinante Produktion der  $\beta$ -(1,3)-(1,4)-Glucanase in *E. coli* BL21 (DE3) mit dem pET 28a ist der Arbeitsgruppe um Teng gelungen. 70 % des produzierten Proteins lagen in „Inclusion Bodys“ vor (Teng et al., 2006).

Einige Arbeitsgruppen konnten die rekombinante Produktion von Glucanasen in unterschiedlichen Organismen zeigen. So konnte eine  $\beta$ -(1,6)-Glucanase aus *T. harzianum* in *S. cerevisiae* rekombinat produziert werden. Das besondere an diesem Ansatz war, dass die Sekretierung des Proteins mit dem Signalpeptid aus *T. harzianum* erfolgte (Lora et al., 1995b, Moy et al., 2002). Das Enzym wurde über den Nachweis der lytischen Aktivität auf Agarplatten mit  $\beta$ -Glucan charakterisiert.

Eine Exo-Glucanase cmg1 aus *Coniothyrium minitans* konnte in *S. cerevisiae* exprimiert und sekretiert werden (Giczey et al., 2001). Die rekombinante Produktion der Endo- $\beta$ -(1,3)-Glucanase (LAMA1) aus *T. viride* in *P. pastoris* ist möglich. In diesem Fall erfolgte eine Sekretierung des Proteins, jedoch scheint die Spaltung des Dipeptides in das native Enzym, durch die KEX-2 Protease der *P. pastoris*, nicht korrekt zu erfolgen (Nobe et al., 2004). Das rekombinante LAMA1 besitzt eine höhere Molmasse als die native Form. Dieses geht möglicherweise auf eine Überglykolysierung oder falsche Spaltung zurück. Die rekombinante Produktion von Exo- $\beta$ -(1,3)-Glucanasen aus *P. angusta*, *D. occidentalis* und *K. lactis* ist ebenfalls in *S. cerevisiae* möglich (Esteban et al., 1999). Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass neben dem Expressionssystem *P. pastoris* auch die Etablierung des Expressionssystems *S. cerevisiae* für weitere Versuche der Produktion einer funktionellen Endo- $\beta$ -(1,3)-Glucanase interessant ist.

#### 4.4. Scleroglucan als Immunmodulator

Seit 2005 ist in der EU der Zusatz von Antibiotika als Wachstumsfaktor im Tierfutter für Masttiere verboten (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung). Dieses Verbot hat das Interesse an ernährungsphysiologischen Zusatzstoffen mit immunstimulierenden Eigenschaften geweckt. Studien an verschiedenen Tieren konnten zeigen, dass  $\beta$ -Glucane, die aus unterschiedlichen Quellen gewonnen wurden, in der Lage sind, das Immunsystem zu aktivieren (Pretus et al., 1991, Li et al., 2006, Harada and Ohno, 2008). Die Untersuchung des selbst produzierten Scleroglucans als eine Alternative gegenüber den Antibiotika als Immunstimulator wurde getestet. Dabei war für uns die Fragestellung wichtig, ob die Molekulargewichtsgröße einen Einfluss auf die Reifung von MoDCs und die Produktion von Interleukinen hat. Diesbezüglich wurden Fraktionen mit einem Molekulargewichts von 5.000 g/mol (A), 5.000 – 10.000 g/mol (B), 10.000 – 100.000 g/mol (C) und > 100.000 g/mol (D) getestet. Abbildung 3-35 zeigt die Ergebnisse für die Interleukine IL-6 und TNF $\alpha$ . Die Fraktion A mit max. 5000 g/mol hat sowohl nach 6, 24 und 48 h den höchsten Anteil an TNF $\alpha$ . Die anderen Molekulargewichtsfractionen zeigen einen wesentlich geringeren Einfluss auf die TNF $\alpha$ -Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei IL-6 ist keine Abhängigkeit vom Molekulargewicht zu erkennen. TNF $\alpha$  kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine anregen, dabei ist es an lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt. Es konnte mittels *in vitro* Studien gezeigt werden, dass die Fraktion A einen positiven Einfluss auf die Reifung und Aktivierung der MoDC's hat (Bimczok et al., 2009). Die Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80/86 auf den MoDC's ist vergleichbar mit dem Effekt der Induktion von LPS/TNF $\alpha$ . LPS und TNF $\alpha$  sind bekanntermaßen starke Stimulatoren für die DC Aktivierung und Reifung (Uchi et al., 2002). MoDC, die mit dem niedermolekularen Scleroglucan behandelt wurden oder zur positiv Kontrolle mit LPS/TNF $\alpha$ , zeigen ebenfalls noch einen typischen Effekt für die DC-Reifung: den Verlust der Fähigkeit zur Antigen-Aufnahme (Bimczok et al., 2009). Unter Berücksichtigung, dass unreife DC's eine entzündungshemmende Wirkung induzieren und reife DC's die aktive Immunität, kann davon ausgegangen werden, dass die mit Scleroglucanhydrolysaten behandelten MoDC's einen potenten Induktor für die T-Zellproliferation darstellen. So konnte gezeigt werden, dass mit der Molmassenfraktion A und B behandelte MoDC's eine höher Kapazität bei der

Lymphocyten-Proliferation aufweisen als die Molekulargewichtsfractionen C und D (Bimczok et al., 2009). Bei der Lymphocyten-Proliferation zeigte sich bei der Stimulierung mit den Fraktionen A ( $\leq 5$  kDa) und B (5 - 10 kDa) eine 1,5 fach stärkere Kapazität im Vergleich zur Zugabe von LPS und TNF $\alpha$ . Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchung ist, dass das Molekulargewicht des Scleroglucans die Zytokinausschüttung, Aktivierung und Reifung der MoDC beeinflusst. Offensichtlich ist die tertiäre tripelhelikale Struktur des Scleroglucans nicht der Auslöser für die Immunstimulation. Sie hat sogar einen negativen Einfluss auf die Zytokinstimulierung (Fraktion C und D). Die Fraktionen C und D besitzen Molekulargewichte  $> 100$  kDa und zeigen eine geringe Wirksamkeit bei der MoDC Reifung und Aktivierung. Die Tripelhelix löst sich ab einem Molekulargewicht von  $\leq 50$  kDa auf (Takemasa Kojima, 1984). Wahrscheinlich sind kleinere Moleküle ohne Sekundärstruktur für die MoDC leichter zugänglich.

Studien zum Einfluss von Polysacchariden auf DC's wurden auch an anderen Spezies durchgeführt. Murine DC's, angeregt durch *Candida*  $\beta$ -Glucan, zeigten eine höhere Freisetzung von IL-12, die ähnlich der Stimulierung durch LPS waren (Kikuchi et al., 2002). Saure Polysaccharide, isoliert als Extrakt des Pilzes *Phellinus linteus*, ergaben eine erhöhte Oberflächenexpression von CD80, CD86, MHC-I und MHC-II in murinen DC's (Park et al., 2003). Das isolierte Heteropolymer aus *Ganoderma lucidum* weist eine erhöhte Koexpression von CD11 und MHC-IA Molekülen an der Oberfläche der DC's der Maus auf (Cao and Lin, 2002). Die Untersuchung der Pharmakokinetik von Glucan-Phosphat, Laminarin und Scleroglucan nach oraler Verabreichung von 1 mg/kg an Ratten zeigte, dass die  $\beta$ -Glucane von intestinalen Epithelzellen des darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) gebunden und internalisiert werden. Glucane modulieren ebenfalls die Expression von Pattern-Recognition Rezeptoren und IL-12 im GALT als Infektionsschutz (Rice et al., 2005). *In vivo* Studien über die Auswirkung der oralen Verabreichung von  $\beta$ -Glucanen an Schweinen oder Absatzferkeln führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Eine Zufütterung von 50 mg *G. lucidum* (GLF) pro Kilogramm Futter ergab das beste Wachstum, den höchsten Antikörpertiter bei einer Viruserkrankung (Pseudorabies) und eine Abnahme des Blutzuckerspiegels. Es wurde auch gezeigt, dass GLF die zellvermittelte Immunantwort hochreguliert durch die Expression der Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$  in verschiedenen lymphatischen Geweben (Chen and Raymond, 2008). Die Fütterung von 50 mg  $\beta$ -(1,3)-(1,6)-Glucan pro Kilogramm Futter bei Absatzferkeln führte zu einem quadratischen Anstieg der durchschnittlichen täglichen Zunahme und Futterverwertung, aber zu keinem signifikanten Effekt auf den Wachstumshormonspiegel. Die Lymphocytenproliferation, Serum-IgG und die

Plasmakonzentration des Prostaglandin E2 variierte linear innerhalb der Supplementierung von 25 - 200 mg/kg Futter. Im Gegensatz dazu führt die Ergänzung der Ernährung mit 0,02 % (w/w)  $\beta$ -Glucan aus *S. cerevisiae* (GlucaGen, Enbiotec Company, Seoul Südkorea) an Absatzferkeln nur zu schwachen Effekten auf das Wachstum, die Nährstoffaufnahme und die Immunität gegenüber Antibiotika (Hahn et al., 2006).

Die Studie mit Imunoglucan<sup>®</sup> (HEBRON, Farmacêutica, Recife, Brasilien) aus *S. cerevisiae* zeigte bei der oralen Abgabe von 150 mg/kg bei Mäusen (Balb/c), welche mit *Listeria monocytogenes* infiziert waren, eine Überlebensrate von 40 %. Dabei konnte eine Abregulierung von IL-6 und INF- $\gamma$  festgestellt werden (Torello et al., 2010).

Eine Studie an gnotobiotischen (keimfreien) Ferkeln, welche oral mit F4ac+ immunisiert und über 5 Wochen mit Macrograd<sup>®</sup> (*S. cerevisiae*) gefüttert wurden, zeigte, dass das Glucan nicht in der Lage war, die F4 spezifische Immunantwort zu unterdrücken. Es konnte keine signifikante Veränderung in der Antikörperkonzentration im Serum festgestellt werden (Stuyven et al., 2010).

Diese zwei Studien weisen deutlich unterschiedliche Ergebnisse auf, obwohl hier  $\beta$ -Glucan aus dem gleichen Organismus verwendet wurde. Dieses liegt möglicherweise an der Wahl der Versuchstiere Maus und Ferkel, oder an der Art der Herstellung bzw. Aufarbeitung des  $\beta$ -Glucans. In beiden Veröffentlichungen fehlen die Angaben über die Molekulargewichtsgröße der  $\beta$ -Glucane, die, wie wir zeigen konnten, einen entscheidenden Einfluss haben. Da dieser Aspekt oft nicht beachtet wird, könnte hier eine Erklärung der kontroversen Ergebnisse in der Literatur vorliegen.

Ein weiterer, noch nicht gänzlich verstandener Vorgang, ist die Bindung der Polysaccharide an die Membranrezeptoren. Ein für die Polysaccharide wichtiger Rezeptor ist das Dectin-1. Dabei konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die minimale Länge von  $\beta$ -Glucanen, die an Dectin-1 binden, von 10 Monomeren haben (Palma et al., 2006). Der heutige Stand der Forschung geht davon aus, dass Dectin-1 Monomere unabhängig an Polysaccharid-Oligomere binden. Im cytoplasmatischen Bereich sollen zwei benachbarte Dectin-1 Monomere die Syk Kinase aktivieren (Rogers et al., 2005). Dabei kann es natürlich sein, dass mehrere Dectin-1 Monomere an ein Polysaccharid binden.

Das Ziel der Versuche ist die orale Verabreichung von Scleroglucan im Futtermittel des Schweins. Aus diesem Grund wurde auch der intestinale Abbau untersucht. Dazu wurde eine Methode entwickelt, die den Nachweis von Scleroglucan möglich macht, auch nach Kontamination mit Darminhalt. Getestet wurde gefriergetrockneter Darminhalt aus Schwein, Pferd und Rind.



Nach der Inkubation mit Pferdedarminhalt konnte eindeutig ein Abbau des Scleroglucans festgestellt werden. Dies ist an der Abnahme des fällbaren Scleroglucans, der Viskosität und der reduzierenden Enden zu erkennen (Abbildung 3-40). Der Abbau wird durch die im Darminhalt vorhandenen Mikroorganismen verursacht.

Die Inkubation mit Schweinedarminhalt ergab keine Abnahme des fällbaren Scleroglucans, sondern eine leichte Zunahme (Abbildung 3-40), möglicherweise verursacht durch kleine Partikel und Mikroorganismen, die durch die hohe Viskosität nicht vollständig abzentrifugiert werden konnten. Die Viskosität blieb ebenfalls erhalten. Beides weist daraufhin, dass Scleroglucan nicht abgebaut wurde und die Abweichungen bei den reduzierenden Enden durch die Schwankungen in den Zusammensetzungen des Darminhaltes entstehen.

Der Panseninhalt (Rind) hatte, ähnlich wie bei dem Pferd, einen eindeutigen Effekt auf das Scleroglucan. Nach der Inkubation war die Viskosität bei beiden Ansätzen stark herabgesetzt. Dies und die fast vollständige Abnahme der reduzierenden Enden auf 5 % des Ausgangswertes zeigte, dass das Scleroglucan fast vollständig abgebaut wird.

Beim Darminhalt des Schweins ist also keine signifikante Veränderung am Scleroglucan zu erkennen, während beim Pferde- und Pansen-Darminhalt ein deutlicher Abbau stattgefunden hat. Die Zusammensetzung der Darmflora richtet sich nach dem Lebensraum und der Nahrung des Tieres. Schweine sind Omnivoren und werden hauptsächlich mit leicht verdaulichem Futter wie Getreide oder Soja gefüttert. Daher ist es für das Tier nicht wichtig einen zelluloseabbauenden Verdauungstrakt in Form eines großen Caecums zu entwickeln. Durch die Art des Futters reichern sich in der Darmflora keine oder nur wenige pflanzenfaserabbauenden Mikroorganismen an. Pferde und Rinder dagegen gehören zu den Herbivoren. Bei ihnen ist der Verdauungstrakt auf die Verwertung von Pflanzenfasern durch große Gärkammern, wie den Dickdarm bzw. den Pansen, ausgelegt. Die Darmmikroflora ist auf den Abbau spezialisiert und für das Tier lebensnotwendig. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der Abbau des Scleroglucans durch den Panseninhalt stärker ist als durch den Pferdedarminhalt. Die im Pansen vorhandenen Mikroorganismen beinhalten daher Enzyme, die spezifischer die 1,3- $\beta$ -D-Glucopyranoseeinheiten spalten können.

Als Fazit kann gesagt werden, dass eine Fütterung von Scleroglucan zur Immunstimulation im Rind nicht sinnvoll ist, da das Scleroglucan beim Rind schon im Pansen von Mikroorganismen zersetzt wird und daher später nur als Glucose aufgenommen wird. Im Pferd erfolgt der Abbau spätestens im Caecum, wo der größte Teil der Mikroorganismen des Darmtraktes sitzt. Ob hier eine Fütterung mit Scleroglucan sinnvoll ist, müsste durch weitere Studien über den vorgelagerten Darmtrakt geklärt werden. Beim Schwein ergibt sich ein

anderes Bild, denn hier wird das Scleroglucan durch die Darmflora nicht abgebaut. Daher ist eine Verfütterung von definierten Molekulargewichtsfractionen möglich.

Über die Mechanismen, wie die Polysaccharide immunologische Funktionen im überaus komplexen Magen-Darm-Trakt ausüben können, kann nach heutigem Forschungsstand nur spekuliert werden. Es ist möglich, dass Glucane teilweise oder ganz von Darmbakterien hydrolysiert werden. Die Glucane wirken entweder am Darm-Epithel lokal oder systemisch durch eine Aufnahme in den Blutkreislauf. Aktuell wird der Zusammenhang zwischen der Biokonversion von Polysacchariden, ihrer Bioverfügbarkeit und ihrer Auswirkung auf den Stoffwechsel und die Physiologie des Wirtes untersucht (Jacobs, 2009). Diese Ansätze der Colon-Fermentation bieten neue Einblicke in die Darm-Mikroben und finden auch immer mehr Interesse in Hinblick auf die menschliche Gesundheit (Arasaradnam et al., 2009, Possemiers et al., 2009). Für weitere Aussagen sind zusätzliche Studien mit charakterisierten und definierten Polysacchariden notwendig. Dabei muss beachtet werden, dass sich viele Untersuchungen auf ein bestimmtes  $\beta$ -Glucan beziehen und dann oft auf alle anderen  $\beta$ -Glucane extrapoliert werden. Dabei ist zu beachten, dass bei ähnlicher Struktur und ähnlichem Molekulargewicht erhebliche Unterschiede in der biologischen Aktivität *in vitro* und *in vivo* auftreten. Durch die Existenz von strukturell unterschiedlichen  $\beta$ -Glucanen und Aufarbeitungsbedingungen wird deutlich, dass jedes  $\beta$ -Glucan für sich untersucht werden muss.

## 5. Zusammenfassung

Scleroglucan ist ein extrazelluläres  $\beta$ -Glucan, welches vom filamentös wachsenden Pilz *Sclerotium rolfsii* produziert wird. Scleroglucan ist ein neutrales Homopolymer, das nur aus Glucose besteht. Durch die Gelpermeationschromatographie gekoppelt an einen Viskositäts- und Brechungsindexdetektor ist es gelungen, über die universelle Kalibrierung Molekulargewichte vom Scleroglucan zu bestimmen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von Salzen und Stabilisatoren beachtet werden muss.

Durch Ultraschallabbau von nativem Scleroglucan konnten eigene Standards produziert werden, die sich in die universelle Kalibrierung mit Pullulan-Standards (DIN-Pullulan) einfügen lassen.

Der Abbau von Scleroglucan ist sowohl thermisch als auch enzymatisch möglich ist. Bei 121 °C über 72 h entstehen jedoch keine verschiedenartigen Molekulargewichtsfractionen. Die Anwendung von Enzymgemischen zeigte, dass kein Enzym eine reine Endoglucanase-Aktivität besitzt. Es ist jedoch gelungen, mit Hilfe des kommerziell erhältlichen und preisgünstigen Enzyms Cellupract<sup>®</sup> AS 100 (ca. 5 €/25 kg) der Fa. Biopract (Berlin), eine Fraktion mit definiertem Molekulargewicht zu gewinnen. Primär werden oligomere Scleroglucane mit einem Molekulargewicht von ca. 4.000 bzw. 6.000 g/mol gebildet, die das gleiche Verzweigungsmuster (<sup>13</sup>C-NMR, Dr. Wray, HZI) wie das native Molekül besitzen.

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Scleroglucan konnte in Kooperation mit Prof. Breves (TiHo Hannover) nachgewiesen werden, dass natives Scleroglucan nicht in der Lage ist, die Darmwand des Schweins zu passieren. Aus Untersuchungen von gefriergetrocknetem Darminhalt von Schwein, Rind und Pferd (TiHo Hannover) ging hervor, dass eine Verstoffwechslung des Scleroglucans von der Mikroorganismenpopulation der Tiere abhängig ist. Es erfolgte ein Abbau des Scleroglucans beim Rind und Pferd, jedoch war keine Degradation des Scleroglucans beim Schwein festzustellen.

Ein Durchbruch in dem Nachweis der immunstimulierenden Wirkung von degradierten Scleroglucanen ergab sich bei porcinen Dendritischen Zellen (MoDC). In Abhängigkeit vom Molekulargewicht zeigten die MoDC eine verstärkte Reifung (erhöhte Expression der Reifungsmarker CD40 und CD80/86), verminderte Endozytoseaktivität und erhöhte stimulatorische Aktivität in Form von verstärkter Zytokinbildung (Kooperation mit Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg).

## 6. Abstract

The filamentous growing fungus *Sclerotium rolfsii* produces an extracellular  $\beta$ -glucan named scleroglucan. It is a member of neutral homopolymers and thus the determination of the molecular weight is impeded.

To determine the molecular weight, a method has been successfully developed using a universal calibration for size exclusion chromatography coupled with viscosity allowing to measure precisely the molecular weight of scleroglucan. It was shown that an influence of salts and stabilizers can be observed. Own reference standards were produced by ultrasonic degradation of nativescleroglucan. The combination of pullulan reference standards and scleroglucan references gave a feasible equation.

The degradation of Scleroglucan is possible by thermic, ultrasonic and attack. For 72 h at 121 °C formation of different molecular weight fractions failed only glucose was released. All enzymes mixtures tested showed combined endo- and exoglucanase activity in different extend. Using the commercially available and inexpensive enzyme Cellupract ® AS 100 (about 5 € / 25 kg) from Biopract (Berlin), a defined molecular weight was produced. An oligomeric scleroglucan is primarily formed yielding a molecular weight between 4,000 and 6,000 g/mol with the same branching pattern ( $^{13}\text{C}$ -NMR, Dr. Wray, HZI) as the native molecule.

In cooperation with Prof. Breves (TiHo Hannover) we showed with the help of fluorescence labeling that native scleroglucan can't pass through the intestinal wall of swine. Tests using lyophilized intestinal contents of swines, cattle and horses (TiHo Hannover) offered that the degradation of Scleroglucan is depending on the microbial population of the animal. Total hydrolysis occurred in cattle and horses. However, in pig Scleroglucan was stable against microbial attack.

An immune-stimulating effect by degraded scleroglucan was detected in porcine dendritic cells (MoDC) (cooperation with Otto-von Guericke University, Magdeburg). Depending on the molecular weight, increased MoDC maturation (increased expression of maturation markers CD40 and CD80/86), decreased endocytosis activity and stimulatory activity in terms of increased cytokine release was detected.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adams DJ (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150:2029-2035.
- Amey RC, Mills PR, Bailey A, Foster GD (2003) Investigating the role of a *Verticillium fungicola*  $\beta$ -1,6-glucanase during infection of *Agaricus bisporus* using targeted gene disruption. *Fungal Genetics and Biology* 39:264-275.
- Anderson JW (1983) Plant Fiber and Blood Pressure. *Annals of Internal Medicine* 98:842-846.
- Arasaradnam RP, Pharaoh MW, Williams GJ, Nwokolo CU, Bardhan KD, Kumar S (2009) Colonic fermentation – More than meets the nose. *Medical hypotheses* 73:753-756.
- Bauer MW, Driskill LE, Kelly RM (1998) Glycosyl hydrolases from hyperthermophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 9:141-145.
- Behall KM, Scholfield DJ, Hallfrisch J (1997) Effect of beta-glucan level in oat fiber extracts on blood lipids in men and women. *Journal of the American College of Nutrition* 16:46-51.
- Bes B, Pettersson B, Lennholm H, Iversen T, Eriksson KE (1987) Synthesis, structure and enzymatic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved cultures of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 9:310-318.
- Bimczok D, Wrenger J, Schirrmann T, Rothkötter HJ, Wray V, Rau U (2009) Short chain regioselectively hydrolyzed scleroglucans induce maturation of porcine dendritic cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82:321-331.
- Bingham SA (1990) Mechanisms and experimental and epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer. *Proceedings of the Nutrition Society* 49:153-171.
- Bluhm TL, Deslandes Y, Marchessault RH, Pérez S, Rinaudo M (1982) Solid-state and solution conformation of scleroglucan. *Carbohydrate Research* 100:117-130.
- Boa JM, LeDuy A (1987) Pullulan from peat hydrolyzate fermentation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering* 30:463-470.
- Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME (2004) Mushrooms, Tumors, and Immunity: An Update. *Experimental Biology and Medicine* 229:393-406.
- Bot A, Smorenburg HE, Vreeker R, Pâques M, Clark AH (2001) Melting behaviour of schizophyllan extracellular polysaccharide gels in the temperature range between 5 and 20°C. *Carbohydrate Polymers* 45:363-372.
- Bourdon I, Yokoyama W, Davis P, Hudson C, Backus R, Richter D, Knuckles B, Schneeman BO (1999) Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan. *American Journal of Clinical Nutrition* 69:55-63.
- Bourne Y, Henrissat B (2001) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: Families and functional modules. *Current Opinion in Structural Biology* 11:593-600.
- Braaten JT, Scott FW, Wood PJ, Riedel KD, Wolynetz MS, Brule D, Collins MW (1994a) High beta-glucan oat bran and oat gum reduce postprandial blood glucose and insulin in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* 11:312-318.
- Braaten JT, Wood PJ, Scott FW, Wolynetz MS, Lowe MK, Bradley-White P, Collins MW (1994b) Oat beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 48:465-474.
- Brigand G (1993) Scleroglucan. *Industrial Gums* 461-474.
- Bucciaglia PA, Smith AG (1994) Cloning and characterization of Tag 1, a tobacco anther  $\beta$ -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution. *Plant Molecular Biology* 24:903-914.
- Burley VJ, Leeds AR, Blundell JE (1987) The effect of high and low-fibre breakfasts on hunger, satiety and food intake in a subsequent meal. *International Journal of Obesity* 11 Suppl 1:87-93.
- Cao L-Z, Lin Z-B (2002) Regulation on maturation and function of dendritic cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Immunology Letters* 83:163-169.
- Chasan R (1991) Lipid Transfer Proteins: Moving Molecules? *Plant Cell* 3:842-843.
- Chen J, Raymond K (2008) Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Journal of Vascular Health and Risk Management* 4:1265-1272.

- Chen L, Fincher GB, Hoj PB (1993) Evolution of polysaccharide hydrolase substrate specificity. Catalytic amino acids are conserved in barley 1,3-1,4- and 1,3- $\beta$ -glucanases. *Journal of Biological Chemistry* 268:13318-13326.
- Cheng YM, Hong TY, Liu CC, Meng M (2009) Cloning and functional characterization of a complex endo- $\beta$ -1,3- glucanase from *Paenibacillus* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:1051-1061.
- Copa-Patiño J, Reyes F, Pérez-Leblic MI (1989) Purification and properties of a 1,3- $\beta$ -glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *FEMS Microbiology Letters* 65:285-291.
- Crittenden R, Karppinen S, Ojanen S, Tenkanen M, Fagerström R, Mättö J, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Poutanen K (2002) In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:781-789.
- De La Cruz J, Hidalgo-Gallego A, Lora JM, Benitez T, Pintor-Toro JA, Llobell A (1992) Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry* 206:859-867.
- De La Cruz J, Llobell A (1999) Purification and properties of a basic endo- $\beta$ -1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. *European Journal of Biochemistry* 265:145-151.
- de la Cruz J, Pintor-Toro J, Benitez T, Llobell A, Romero L (1995a) A novel endo-beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 177:6937-6945.
- de la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benitez T, Llobell A (1995b) Purification and characterization of an endo-beta-1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal of Bacteriology* 177:1864-1871.
- De la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benitez T, Llobell A (1995c) Purification and characterization of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal of Bacteriology* 177:1864-1871.
- de la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benitez T, Llobell A, Romero LC (1995d) A novel endo-beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 177:6937-6945.
- De la Cruz J, Pintor-Toro JA, Benitez T, Llobell A, Romero LC (1995e) A novel endo- $\beta$ -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 177:6937-6945.
- de las Mercedes Dana M, Limón MC, Mejías R, Mach RL, Benítez T, Pintor-Toro JA, Kubicek CP (2001) Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 38:335-342.
- Drenth J, Low BW, Richardson JS, Wright CS (1980) The toxin-agglutinin fold. A new group of small protein structures organized around a four-disulfide core. *Journal of Biological Chemistry* 255:2652-2655.
- Duncker S (2005) Auswirkung von oral verabreichtem *Escherichia coli* Nissle 1917 auf das Darm-assoziierte Immunsystem des Schweins.
- El-Katatny MH, Somitsch W, Robra KH, El-Katatny MS, Gübitz GM (2000) Production of Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology* 38:173-180.
- Esteban PF, Vazquez De Aldana CR, Del Rey F (1999) Cloning and characterization of 1,3- $\beta$ -glucanase-encoding genes from non-conventional yeasts. *Yeast* 15:91-109.
- Faivre J, Bonithon-Kopp C (1999) Diet, fibers, and colon cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 472:199-206.
- Fincher GB (1989) Molecular and Cellular Biology Associated with Endosperm Mobilization in Germinating Cereal Grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:305-346.
- Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RAB (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology* 10:363-372.
- Frost G, Leeds AA, Dore CJ, Madeiros S, Brading S, Dornhorst A (1999) Glycaemic index as a determinant of serum HDL-cholesterol concentration. *Lancet* 353:1045-1048.

- Futatsuyama H, YUI T, OGAWA K (1999) Viscometry of Curdlan, a Linear (1→3)-β-D-Glucan, in DMSO or Alkaline Solutions. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 63:1481-1483.
- Gao W, Wu Y, Yang H (2008) Cloning of beta-1,3-glucanase gene from *Trichoderma virid* LTR-2 and its expression in *Pichia pastoris*. 48:239-243.
- Giczey G, Kerényi Z, Fülöp L, Hornok L (2001) Expression of cmg1, an exo-β-1,3-glucanase gene from *Coniothyrium minitans*, increases during sclerotial parasitism. *Applied and Environmental Microbiology* 67:865-871.
- Grenier J, Potvin C, Asselin A (1993) Barley Pathogenesis-Related Proteins with Fungal Cell Wall Lytic Activity Inhibit the Growth of Yeasts. *Plant Physiology* 103:1277-1283.
- Grubisic Z, Rempp P, Benoit H (1967) A universal calibration for gel permeation chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* 5:753-759.
- Haarstrick A, Rau U (1993) Strömungs-Charakteristik pseudoplastischer Polysaccharid-Lösungen von *Schizophyllum commune*. *Chemie Ingenieur Technik* 65:556-559.
- Hahn T-W, Lohakare JD, Lee SL, Moon WK, Chae BJ (2006) Effects of supplementation of {beta}-glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs. *Journal of Animal Science* 84:1422-1428.
- Halleck FE (1967) Polysaccharides and methods for production thereof. United States: Pillsbury Co.
- Harada T, Misaki A, Saito H (1968) Curdlan: A bacterial gel-forming [beta]-1, 3-glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 124:292-298.
- Harada T, Ohno N (2008) Contribution of dectin-1 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) to immunomodulating actions of [beta]-glucan. *International Immunopharmacology* 8:556-566.
- Herbst H, Schumpe A, Deckwer W-D (1992) Xanthan production in stirred tank fermenters: Oxygen transfer and scale-up. *Chemical Engineering & Technology* 15:425-434.
- Hong T-Y, Hsiao Y-Y, Meng M, Li TT (2008) The 1.5 Å structure of endo-1,3-[beta]-glucanase from *Streptomyces sioyaensis*: evolution of the active-site structure for 1,3-[beta]-glucan-binding specificity and hydrolysis. *Acta Crystallographica Section D* 64:964-970.
- Ilari A, Fiorillo A, Angelaccio S, Florio R, Chiaraluce R, Oost Jvd, Consalvi V (2009) Crystal structure of a family 16 endoglucanase from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* structural basis of substrate recognition. *FEBS Journal* 276:1048-1058.
- Ishikawa K. SH, Tsubaki K., Shoji Y., (2004) JP200423652. vol. JP200423652.
- Jacobs DMG, Estelle; Duynhoven, John v.; Vaughan, Elaine E. (2009) Non-Digestible Food Ingredients, Colonic Microbiota and the Impact on Gut Health and Immunity: A Role for Metabolomics. *Current Drug Metabolism* 10:41-54.
- Kahlon T. S. CFI, Knuckles B. E. , Chiu M. M. (1993) Cholesterol-Lowering Effects in Hamsters of 1/3-Glucan-Enriched Barley Fraction, Dehulled Whole Barley, Rice Bran, and Oat Bran and Their Combinations. *Cereal Chemistry* 70:435-440.
- Karppinen S, Liukkonen K, Aura A-M, Forssell P, Poutanen K (2000) *In vitro* fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1469-1476.
- Kawai R, Igarashi K, Yoshida M, Kitaoka M, Samejima M (2006) Hydrolysis of β-1,3/1,6-glucan by glycoside hydrolase family 16 endo-1,3(4)-β-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71:898-906.
- Keitel T, Simon O, Borriss R, Heinemann U (1993) Molecular and active-site structure of a *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:5287-5291.
- Keogh GF, Cooper GJ, Mulvey TB, McArdle BH, Coles GD, Monro JA, Poppitt SD (2003) Randomized controlled crossover study of the effect of a highly {beta}-glucan-enriched barley on cardiovascular disease risk factors in mildly hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition* 78:711-718.
- Kikuchi T, Ohno N, Ohno T (2002) Maturation of dendritic cells induced by *Candida* [beta]-glucan. *International Immunopharmacology* 2:1503-1508.
- Kim DJ, Baek JM, Uribe P, Kenerley CM, Cook DR (2002) Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. *Current Genetics* 40:374-384.
- Köksel H, Edney MJ, Özkaya B (1999) Barley Bulgur: Effect of Processing and Cooking on Chemical Composition. *Journal of Cereal Science* 29:185-190.

- Kritzman G, Chet I, Henis Y (1978) Localization of  $\beta$ -(1,3)-glucanase in the mycelium of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Bacteriology* 134:470-475.
- Kulicke W-M, Lettau AI, Thielking H (1997) Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1 $\rightarrow$ 3)-[ $\beta$ ]-glucans. *Carbohydrate Research* 297:135-143.
- Lawford H, Rousseau J (1989) Effect of oxygen on the rate of  $\beta$ -1,3-glucan microbial exopolysaccharide production. *Biotechnology Letters* 11:125-130.
- Lazaridou A, Biliaderis CG, Izydorczyk MS (2003) Molecular size effects on rheological properties of oat [ $\beta$ ]-glucans in solution and gels. *Food Hydrocolloids* 17:693-712.
- Lecacheux D, Mustiere Y, Panaras R, Brigand G (1986) Molecular weight of scleroglucan and other extracellular microbial polysaccharides by size-exclusion chromatography and low angle laser light scattering. *Carbohydrate Polymers* 6:477-492.
- Li J, Li DF, Xing JJ, Cheng ZB, Lai CH (2006) Effects of  $\beta$ -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotrophic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 84:2374-2381.
- Lobas D, Schumpe S, Deckwer WD (1992) The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314). *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:411-415.
- Lora JM, De la Cruz J, Llobell A, Benitez T, Pintor-Toro JA (1995a) Molecular characterization and heterologous expression of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Molecular and General Genetics* 247:639-645.
- Lora JM, De La Cruz J, Llobell A, Benitez T, Pintor-Toro JA (1995b) Molecular characterization and heterologous expression of an endo- $\beta$ -1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Molecular and General Genetics* 247:639-645.
- Lorito M (1998) Chitinolytic enzymes and their genes. *Trichoderma and Gliocladium* 2:73-99.
- Louis Du Pasquier F, and Kristina Miller (ed.) (2006) Evolution of the Immune System. In *fundamental immunology*: Paul, ed.
- Maki KC, Davidson MH, Ingram KA, Veith PE, Bell M, Gugger E (2003) Lipid responses to consumption of a  $\beta$ -glucan containing ready-to-eat cereal in children and adolescents with mild-to-moderate primary hypercholesterolemia. *Nutrition Research* 23:1527-1535.
- Martín-Cuadrado AB, Dueñas E, Sipiczki M, Vázquez de Aldana CR, del Rey F (2003) The endo- $\beta$ -1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science* 116:1689-1698.
- Martin K, McDougall BM, McIlroy S, Jayus, Chen J, Seviour RJ (2007) Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal (1,3)- and (1,6)-glucanases. *FEMS Microbiology Reviews* 31:168-192.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T (1988) Antifungal Hydrolases in Pea Tissue : II. Inhibition of Fungal Growth by Combinations of Chitinase and { $\beta$ }-1,3-Glucanase. *Plant Physiology* 88:936-942.
- Mok PK, Hwa PB, Sung S, Sung KM, Su KJ, Young-Taek K, Gu LS, Chul LD (1999) Liquid culture of *Schizophyllum commune* fr. for separation of  $\beta$ -1,6-branched-1,3-glucan, and preparation composition for external use, containing  $\beta$ -1,6-branched-1,3-glucan produced by the liquid culture. vol. JP000011313667AA.
- Montero M, Sanz L, Rey M, Monte E, Llobell A (2005) BGN16.3, a novel acidic  $\beta$ -1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *FEBS Journal* 272:3441-3448.
- Mouyna I, Monod M, Fontaine T, Henrissat B, L  chenne B, Latg   JP (2000) Identification of the catalytic residues of the first family of  $\beta$ (1-3)glucanosyltransferases identified in fungi. *Biochemical Journal* 347:741-747.
- Mouyna I, Sarfati J, Recco P, Fontaine T, Henrissat B, Latge JP (2002) Molecular characterization of a cell wall-associated  $\beta$ (1-3)endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* 40:455-464.
- Moy M, Li HM, Sullivan R, White Jr JF, Belanger FC (2002) Endophytic fungal  $\beta$ -1,6-glucanase expression in the infected host grass. *Plant Physiology* 130:1298-1308.



- Münzberg J, Rau U, Wagner F (1995) Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched [beta]-1,3-glucan. *Carbohydrate Polymers* 27:271-276.
- Nakazawa H, Okada K, Kobayashi R, Kubota T, Onodera T, Ochiai N, Omata N, Ogasawara W, Okada H, Morikawa Y (2008) Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:681-689.
- Nardin R, Vincendon M (1989) Isotopic exchange study of the scleroglucan chain in solution. *Macromolecules* 22:3551-3554.
- Nickel R, A. Schummer u. E. SEIFERLE (ed.) (1999) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.*: Parey, Berlin.
- Nobe R, Sakakibara Y, Ogawa K, Suiko M (2004) Cloning and expression of a novel *Trichoderma viride* laminarinase AI gene (lamAI). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68:2111-2119.
- Nuero OM, Alfonso C, Del Amo F, Reyes F (1993) Study of  $\beta$ -1,3-glucanase activity during autolysis of *Aspergillus nidulans* by FPLC ion-exchange chromatography. *Letters in Applied Microbiology* 17:104-108.
- Palma AS, Feizi T, Zhang Y, Stoll MS, Lawson AM, Díaz-Rodríguez E, Campanero-Rhodes MA, Costa J, Gordon S, Brown GD, Chai W (2006) Ligands for the  $\beta$ -glucan receptor, dectin-1, assigned using "designer" microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 281:5771-5779.
- Park S-K, Kim G-Y, Lim J-Y, Kwak J-Y, Bae Y-S, Lee J-D, Oh Y-H, Ahn S-C, Park Y-M (2003) Acidic polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* induce phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312:449-458.
- Pielken P, Stahmann P, Sahm H (1990) Increase in glucan formation by *Botrytis cinerea* and analysis of the adherent glucan. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33:1-6.
- Pitson SM, Seviour RJ, McDougall BM (1993) Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology* 15:178-192.
- Planas A (2000) Bacterial 1,3-1,4-[beta]-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1543:361-382.
- Possemiers S, Grootaert C, Vermeiren J, Gross G, Marzorati M, Verstraete W, Van de Wiele T (2009) The intestinal environment in health and disease - recent insights on the potential of intestinal bacteria to influence human health. *Current Pharmaceutical Design* 15:2051-2065.
- Pretus HA, Ensley HE, McNamee RB, Jones EL, Browder IW, Williams DL (1991) Isolation, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 257:500-510.
- Ramesh HP, Tharanathan RN (1998) Structural characteristics of a mixed linkage [beta]-glucan from sorghum (*Sorghum bicolor*). *Carbohydrate Research* 308:239-243.
- Rapp P (1989) 1,3- $\beta$ -Glucanase, 1,6- $\beta$ -glucanase and  $\beta$ -glucosidase activities of *Sclerotium glaucum*: Synthesis and properties. *Journal of General Microbiology* 135:2847-2858.
- Rapp P (1992a) Formation, separation and characterization of three [beta]-1,3-glucanases from *Sclerotium glaucum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1117:7-14.
- Rapp P (1992b) Formation, separation and characterization of three  $\beta$ -1,3-glucanases from *Sclerotium glaucum*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1117:7-14.
- Rau U (ed.) (1997) *Biosynthese, Produktion und Eigenschaften von extrazellulären Pilz-Glucanen*: Shaker Verlag.
- Rau U, Haarstrick A, Wagner F (1992) Eignung von Schizophyllan-Lösungen zum Polymerfluten von Erdöl-Lagerstätten mit hoher Temperatur und Salinität. *Chemie Ingenieur Technik* 64:576-577.
- Rau U, Müller RJ, Cordes K, Klein J (1990) Process and molecular data of branched 1,3- $\beta$ -D-glucans in comparison with Xanthan. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 5:89-93.
- Reese ET (1977) Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. *Recent Adv Phytochem* 11:311-367.
- Reese ET, Mandels M (1959) Beta-D-1,3-glucanases in fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 5:173-185.

- Rice PJ, Adams EL, Ozment-Skelton T, Gonzalez AJ, Goldman MP, Lockhart BE, Barker LA, Breuel KF, DePonti WK, Kalbfleisch JH, Ensley HE, Brown GD, Gordon S, Williams DL (2005) Oral Delivery and Gastrointestinal Absorption of Soluble Glucans Stimulate Increased Resistance to Infectious Challenge. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314:1079-1086.
- Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, William Browder I, Williams DL (2002) Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1→3)-β-D-glucans. *Journal of Leukocyte Biology* 72:140-146.
- Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis E Sousa C (2005) Syk-dependent cytokine induction by dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22:507-517.
- Sabatie J, Choplin L, Paul F, Monsan P (1986) The effect of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran. *Biotechnology Letters* 8:425-430.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5467.
- Sasaki T, Takasuka N (1976) Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carbohydrate Research* 47:99-104.
- Schuster R, Wenzig E, Mersmann A (1993) Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39:155-158.
- Shen SH, Chrétien P, Bastien L, Slilaty SN (1991) Primary sequence of the glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica*. Expression and purification of the enzyme from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 266:1058-1063.
- Shimotoyodome A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T (2001) Sulfated Polysaccharides, but Not Cellulose, Increase Colonic Mucus in Rats with Loperamide-Induced Constipation. *Digestive Diseases and Sciences* 46:1482-1489.
- Sier CFM, Gelderman KA, Prins FA, Gorter A (2004) Beta-glucan enhanced killing of renal cell carcinoma micrometastases by monoclonal antibody G250 directed complement activation. *International Journal of Cancer* 109:900-908.
- Skendi A, Biliaderis CG, Lazaridou A, Izydorczyk MS (2003) Structure and rheological properties of water soluble [beta]-glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*. *Journal of Cereal Science* 38:15-31.
- Sletmoen M, Geissler E, Stokke BT (2006) Determination of Molecular Parameters of Linear and Circular Scleroglucan Coexisting in Ternary Mixtures Using Light Scattering. *Biomacromolecules* 7:858-865.
- Sletmoen M, Stokke BT (2008) Higher order structure of (1,3)-beta-D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers* 89:310-321.
- Somogyi M (1952) NOTES ON SUGAR DETERMINATION. *Journal of Biological Chemistry* 195:19-23.
- Stahmann KP, Pielken P, Schimz KL, Sahm H (1992) Degradation of extracellular β-(1,3)(1,6)-D-glucan by *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3347-3354.
- Stahmann KP, Schimz KL, Sahm H (1993) Purification and characterization of four extracellular 1,3-β-glucanases of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* 139:2833-2840.
- Stalljohann G (2006) Untersuchungen zu Fütterungsstrategien für eine erfolgreiche Aufzucht ökologisch gehaltener Ferkel.
- Stokke BT, Elgsaeter A, Bjørnstad EØ, Lund T (1992) Rheology of xanthan and scleroglucan in synthetic seawater. *Carbohydrate Polymers* 17:209-220.
- Stone BA, Clarke AE (1992) Chemistry and Biology of (1→3)-β-Glucans.
- Stuyven E, Van den Broeck W, Nauwynck H, Goddeeris BM, Cox E (2010) Oral administration of beta-1,3/1,6-glucan Macrogard® fails to enhance the mucosal immune response following oral F4 fimbrial immunisation in gnotobiotic pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 137:291-297.
- Sutherland IW (2001a) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3-9.

- Sutherland IW (2001b) Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal* 11:663-674.
- Takemasa Kojima KT, Takeshi Ikumoto and Toshio Yanaki (1984) Depolymerization of Schizophyllan by Controlled Hydrodynamic Shear. *Agricultural and Biological Chemistry* 48:915-921.
- Takeuchi M. NY (1997) JP9009890. vol. JP9009890.
- Tako M (1990) Rheological Properties of Welan Gum in Aqueous Media. *Agricultural and Biological Chemistry* 54:3079-3084.
- Tangarone B, Royer JC, Nakas JP (1989) Purification and Characterization of an Endo-(1,3)-{beta}-D-Glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 55:177-184.
- Teng D, Wang JH, Fan Y, Yang YL, Tian ZG, Luo J, Yang GP, Zhang F (2006) Cloning of beta-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Applied Microbiology and Biotechnology* 72:705-712.
- Thrane C, Tronsmo A, Jensen DF (1997) Endo-1,3-β-glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: Purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *European Journal of Plant Pathology* 103:331-344.
- Torello CO, de Souza Queiroz J, Oliveira SC, Queiroz MLS (2010) Immunohematopoietic modulation by oral [beta]-1,3-glucan in mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Immunopharmacology* In Press, Uncorrected Proof.
- Torres LG, Nienow AW, Sánchez A, Galindo E (1993) The characterization of a viscoelasticity parameter and other rheological properties of various xanthan gum fermentation broths and solutions. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 9:231-237.
- Uchi H, Arrighi J-F, Aubry J-P, Furue M, Hauser C (2002) The sesquiterpene lactone parthenolide inhibits LPS- but not TNF-[alpha]-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells by inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110:269-276.
- Uzuhashi (2000) JP200010036. vol. JP200010036.
- Vázquez-Garcidueñas S, Leal-Morales CA, Herrera-Estrella A (1998) Analysis of the β-1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1442-1446.
- Velázquez M, Davies C, Marett R, Slavin JL, Feirtag JM (2000) Effect of Oligosaccharides and Fibre Substitutes on Short-chain Fatty Acid Production by Human Faecal Microflora. *Anaerobe* 6:87-92.
- Veljkovic VB, Lazic ML, Skala DU (1988) Studies on dextran fermentation broth rheology. *Enzyme and Microbial Technology* 10:686-688.
- Watanabe T, Kasahara N, Aida K, Tanaka H (1992) Three N-terminal domains of beta-1,3-glucanase A1 are involved in binding to insoluble beta-1,3-glucan. *Journal of Bacteriology* 174:186-190.
- Woodward JR, Fincher GB, Stone BA (1983) Water-soluble (1→3), (1→4)-[beta]-D-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. II. Fine structure. *Carbohydrate Polymers* 3:207-225.
- Yamamoto R, Nevins DJ (1983) Degradation of a glucan containing β-(1→3) and β-(1→6) linkages by exo-(1→3)-β-d-glucanase. *Carbohydrate Research* 122:217-226.
- Yanaki T, Tabata K, Kojima T (1985) Melting behaviour of a triple helical polysaccharide schizophyllan in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* 5:275-283.
- Zeilinger S, Galhaup C, Payer K, Woo SL, Mach RL, Fekete C, Lorito M, Kubicek CP (1999) Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genetics and Biology* 26:131-140.
- Zhang H, Nishinari K, Williams MAK, Foster TJ, Norton IT (2002) A molecular description of the gelation mechanism of curdlan. *International Journal of Biological Macromolecules* 30:7-16.

## 7.1. Anhang

Tabelle 7-1: alle Daten zur Bestimmung der Enzymaktivität

Enzymaktivität		$\Delta$ reduzierende Enden	$\Delta$ Glucosefreie Glucose [mmol]		$\Delta$ reduzierende Enden [mmol]	reduzierende Enden		Enzym
Exo	Endo		Ende	Start		Ende	Start	
x	x	0,146	1,427	1,584	0,157	1,573	0,267	AS 100
x		0,001	0,094	0,496	0,402	0,095	0,485	B. subtilis
x	x	0,089	0,398	0,766	0,368	0,487	0,392	BG
		0	0			0		GH16
		0	0			0		GH81
x	x	0,133	0,380	0,936	0,556	0,513	0,64	Laminarinase
							+	NS
x	x	0,621	0,26	0,909	0,649	0,881	1,787	P. funiculosus
x	x	0,406	1,78	2,468	0,688	2,186	0,7	T. harzianum
x	x	0,697	1,248	1,819	0,571	1,945	0,715	T. reesei
x		0,037	1,573	2,065	0,492	1,61	0,585	TBG

